

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Canis

Zytotoxische und genotoxische Auswirkungen von Liquiden für  
E-Zigaretten auf Miniorgankulturen aus humaner  
oropharyngealer Schleimhaut

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Ulrich Vincent Carl Ernst Stucke  
München  
2020

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Baumeister

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Sandra Frank  
Prof. Dr. med. Dr.h.c. Erika von Mutius

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Sven Becker

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

## Eidesstattliche Versicherung

Stucke, Ulrich Vincent Carl Ernst

—

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Zytotoxische und genotoxische Auswirkungen von Liquiden für E-Zigaretten auf  
Miniorgankulturen aus humaner oropharyngealer Schleimhaut**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Düsseldorf, 13.10.2020

Ulrich Vincent Carl Ernst Stucke

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	7
1.1 Epidemiologie der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren .....	7
1.2 Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren .....	8
1.3 Exogene Risikofaktoren .....	10
1.3.1 Tabak als Risikofaktor .....	10
1.4 Die elektronische Zigaretten (E-Zigarette) .....	11
1.4.1 Aufbau und Funktionsweise einer elektronischen Zigarette .....	12
1.4.2 Liquide .....	14
1.4.3 Propylenglykol und Glycerin .....	14
1.4.4 Nikotin .....	15
1.5 Aktuelle Gesetzeslage .....	16
1.5.1 Aktuelle Untersuchungen / Problematik .....	17
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	17
2. Methoden und Material .....	18
2.1 Schematische Darstellung der durchgeführten Versuche .....	19
2.2 Gewebeproben und Patientenkollektiv .....	20
2.3 Miniorgankulturen (MOK) .....	20
2.4 Vorbereitung der 24-Well-Platten .....	21
2.5 Weiterbehandlung der Schleimhautproben .....	21
2.6 Kultivierungsphase .....	22
2.7 Inkubation der Miniorgankulturen mit den verschiedenen Liquiden .....	24
2.8 Einzelzellauftrennung .....	26
2.9 Vitalitätsbestimmung Trypan-Blau .....	27
2.10 Vitalitätsbestimmung mit WST - 8 .....	28
2.11 Alkalisch Mikrogelelektrophorese/ Comet-Assay .....	30
2.11.1 Vorbereiten der Objektträger und Lyse der Kern- und Zellmembran .....	31
2.11.2 Durchführung der Gelelektrophorese und Fluoreszenzfärbung .....	32
2.11.3 Digitale Auswertung der DNA-Migration .....	33
2.11.4 Statistische Analyse .....	33
2.12 Methodenspezifisches Material .....	35
2.12.01 WST-8 .....	35
2.12.02 Miniorgankulturen .....	35
2.12.03 Mikrogelelektrophorese .....	37

2.12.04 Geräte und Zubehör, Verbrauchsmaterial .....	39
3. Ergebnis (Analyse der Zyto- und Genotoxizität) .....	41
3.1 Vitalitätsmessungen zur Analyse der Zytotoxizität .....	41
3.1.1 WST-8 Vitalitätsmessung der Fruchtlíquide .....	41
3.1.2 WST-8 Vitalitätsmessung der Tabaklíquide .....	45
3.1.3 WST-8 Vergleich der Zellvitalität aller Líquide bei 15% .....	48
3.1.4 WST-8 Vergleich der Zellvitalität aller Líquide bei 10% und 25% .....	49
3.2 Auswertung der Gelelektrophorese zur Analyse der Genotoxizität .....	50
3.2.1 Einmalige Gabe des Basislíquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschlíquid .....	50
3.2.2 Wiederholte Gabe des Basislíquid Frucht, sowie des Apfel- und Kirschlíquid .....	53
3.2.3 Einmalige Gabe des Basislíquid Tabak, so wie des Tabaklíquid .....	56
3.2.4 Wiederholte Gabe des Basislíquid Tabak sowie des Tabaklíquid .....	58
3.2.5 Vergleich der Inkubationsarten .....	60
3.2.6 Vergleich aller Líquide bei wiederholter Gabe .....	61
3.2.7 Vergleich aller Líquide bei einmaliger Gabe .....	62
4. Diskussion .....	63
4.1 Auswahl der Patienten .....	63
4.2 Einmalige vs. mehrmalige Inkubation .....	63
4.3 Ausschluss der geno- und zytotoxischen Wirkung der Basislíquide .....	63
4.3.1 Propylenglykol (1,2-Propandiol) .....	64
4.3.2 Glycerin .....	65
4.4 Zytotoxizität der Líquide .....	66
4.4.1 Nikotin .....	67
4.5 Genotoxizität der Líquide .....	68
4.6 Limitationen .....	71
5. Zusammenfassung .....	72
6. Abbildungsverzeichnis .....	73
7. Literaturverzeichnis .....	75

# 1. Einleitung

Elektronische Zigaretten sind Abgabevorrichtungen, die durch eine beheizte Wendel Flüssigkeiten, meist mit Nikotin, zur Verdampfung bringen. Sie haben sich als Alternative zu herkömmlichen Zigaretten in den letzten Jahren stark verbreitet (Ayers et al., 2011; Noel et al., 2011; Trtchounian et al., 2010). Seit dem kommerziellen Markteintritt von elektronischen Zigaretten in den Vereinigten Staaten und Europa ist die Anzahl der Konsumenten rasant gewachsen (Yamin et al., 2010, Pauly et al., 2007). Während die schädlichen Aspekte von konventionellen Zigaretten gut dokumentiert sind (U.S. Department of Health and Human Services, 2010; Shiverick et al. 1999; Talbot et al. 2008), gibt es noch wenige Studien, die sich mit den Auswirkungen der Inhaltsstoffe elektronischer Zigaretten (EZ) und den möglicherweise schädlichen Folgen beschäftigen.

Der große Unterschied zur herkömmlichen Zigarette besteht darin, dass bei einer EZ kein Tabak verbrannt wird und somit kein Teer entsteht. Es gibt Untersuchungen, in denen auf die geringere Anzahl von Chemikalien und insbesondere von Karzinogenen in E-Liquiden hingewiesen wird (Cahn et al., 2011; Lausgesen et al., 2008). Allerdings ist die Vielfalt der flüssigen Aromen und Zusatzstoffe auf dem Markt enorm groß und die exakten Zusammensetzungen der Liquide sind weitgehend unbekannt, sodass nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass keine schädlichen Substanzen in ihnen enthalten sind.

Aktuell gibt es diverse Studien, welche die Auswirkungen von E-Liquiden auf unterschiedliche humane Zellen untersucht haben (Farsalinos et al., 2013, Lerner et al., 2015, Husari et al., 2015; Sancilio et al., 2015). In der vorliegenden Studie wurden erstmals die Auswirkungen von E-Liquiden auf das erste Kontaktorgan für inhalative Fremdstoffe, das Schleimhautepithel des oberen aerodigestiven Traktes, genauer untersucht.

Ziel dieser Studie ist es, die zytotoxischen und genotoxischen Effekte von E-Liquiden auf Schleimhaut-Gewebekulturen des Oropharynx zu untersuchen und herauszufinden, ob E-Liquide ein potentieller Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sind.

## 1.1 Epidemiologie der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren

Nach den Daten der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) wurden im Jahre 2010 in der Bundesrepublik Deutschland 491.326 Krebsneuerkrankungen verzeichnet. Circa 220.000 Menschen verstarben 2010 an den Folgen einer Krebserkrankung.

2010 betrug die Anzahl der neu aufgetretenen Karzinome im Mund- und Rachenraum in der Bundesrepublik Deutschland circa 13.500 Fälle. Es erkrankten circa 10.000 Männer und circa 3.500

Frauen; somit zeigte sich eine nahezu dreimal höhere Inzidenz bei Männern im Vergleich zu Frauen. Ähnliche Zahlen ergeben sich bei der Mortalität. 2011 starben in der Bundesrepublik Deutschland circa 5.000 Menschen an einem Karzinom des Mund- und Rachenraums, davon 3.800 Männer und 1.200 Frauen. Auch die Mortalität hatte demnach bei Männern einen drei mal höheren Wert als bei Frauen. Es zeigte sich, dass sowohl Männer als auch Frauen am häufigsten im Alter von 55-59 Jahren an Tumoren des Mund- und Rachenraums erkrankten (Gekid, 2015).

## **1.2 Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren**

Der Begriff Kopf-Hals-Tumor ist die Bezeichnung für eine Gruppe von Tumoren, welche in der Mundhöhle, dem Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx, den Nasennebenhöhlen, der Nasenhöhle und den Speicheldrüsen lokalisiert sein können. Über 90% der Tumore im Kopf-Hals-Bereich sind Plattenepitheltumore (Suh et al., 2014).

Auch heute noch ist die genaue Entstehung von Tumoren nicht eindeutig geklärt, jedoch wird angenommen, dass für die Entwicklung einer Tumorzelle mehrere Faktoren zusammenkommen müssen. Califano et al. entwickelten ein Modell, mit welchem sie die genetische Progression von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches beschrieben. Sie erklärten die histologische Entwicklung dahingehend, dass sich aus normalen Mukosazellen zuerst eine benigne Hyperplasie entwickelt, die dann in eine Dysplasie übergeht, welche zu einem Karzinom in situ wird, woraus sich letztendlich ein invasives Karzinom bildet. Dieser Pathomechanismus gilt allerdings nicht für die durch das Human Papilloma Virus (HPV) induzierte Karzinogenese, bei der keine histologischen Vorläuferformen bekannt sind. Ebenso erarbeiteten Califano et al. drei für die nicht HPV-induzierte Tumorentstehung essentielle Grundsätze, welche bis heute Gültigkeit haben:

1. Sowohl die Aktivierung von Onkogenen, als auch der Ausfall von Tumorsuppressorgen sind für die Entstehung eines Tumors notwendig
2. Die Tumorentwicklung im Kopf-Hals-Bereich beginnt häufig mit dem Ausfall von Tumorsuppressorgen, die auf den Chromosomen 9p21 oder 3p liegen
3. Es ist nicht wichtig in welcher Reihenfolge die verschiedenen Veränderungen geschehen, sie müssen nur alle zusammen auftreten

(Califano et al., 1996)



Die nachfolgende Abbildung (Abb 1.) verdeutlicht die Tumorentstehung nach Califano.

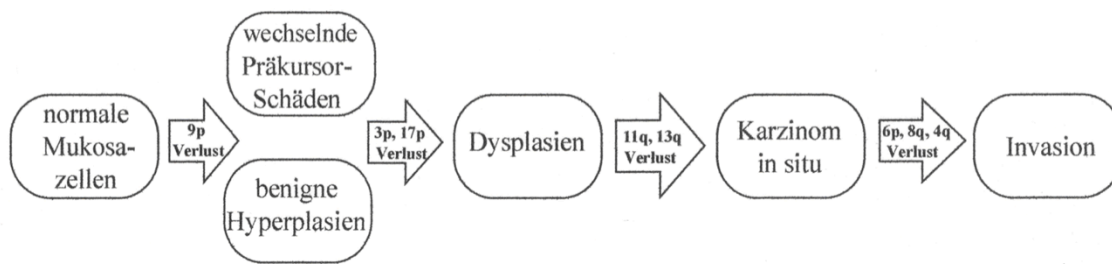


Abb. 1 Modell der genetischen Progression bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich nach Califano

Ein anderes Modell der Karzinogenese wurde von Hanahan et al. beschrieben; es basiert auf sechs essentiellen Veränderungen der Tumorzellbiologie.

Diese Veränderungen umfassen das Vermögen von Tumorzellen, selbst Wachstumssignale zu erzeugen, die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern, die Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), die unbegrenzte Replikationsmöglichkeit, die ununterbrochene Gefäßversorgung und Gefäßneubildung und die Möglichkeit, invasiv in Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden (Hanahan et al., 2000). Die nachfolgende Abbildung (Abb. 2) erklärt die Karzinogenese nach dem 6-Stufen-Prinzip von Hanahan, wobei die Einzelfaktoren in keiner vorgeschriebenen zeitlichen Reihenfolge auftreten müssen. Wenn alle Veränderungen aufgetreten sind, impliziert dies die maligne Transformation einer ehemals gesunden Zelle.

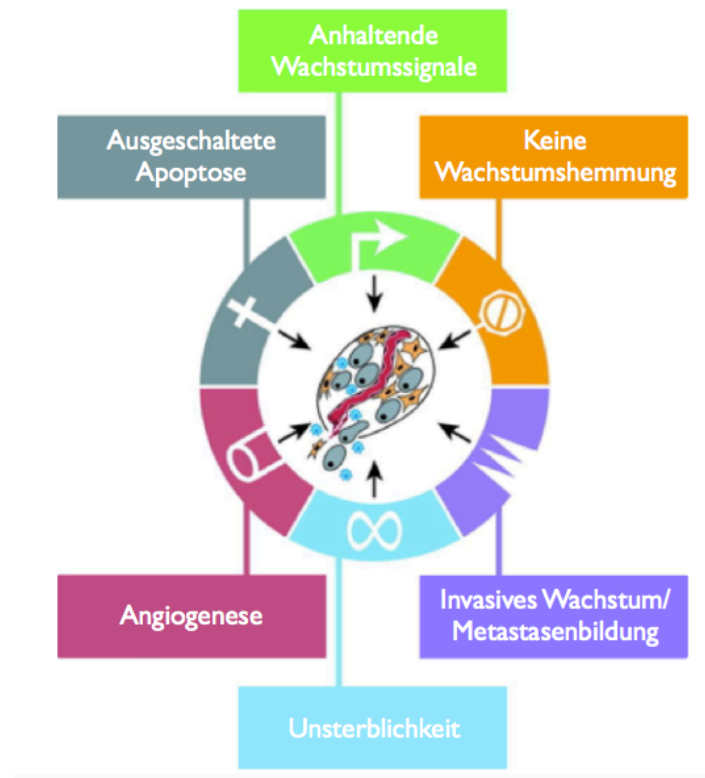


Abb. 2 Charakteristika von Tumoren in Anlehnung an Hanahan et al. (Hanahan et al., 2000)

### 1.3 Exogene Risikofaktoren

Die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren wird mit verschiedenen begünstigenden exogenen Faktoren sowie der Infektion mit Viren in Verbindung gebracht. Neben dem Konsum von Tabakprodukten, auf den in dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird, muss als zweiter Hauptfaktor der Genuss von Alkohol genannt werden (Hashibe et al., 2007). Weitere begünstigende Faktoren sind die Infektion mit dem Human Papilloma Virus, besonders der Subtypen 16 und 18 (Ndiaye et al., 2014)) und dem Epstein Barr Virus (EBV), besonders des Subtyp M81 (Tsai et al., 2013). Darüber hinaus spielen der Konsum von Betelpfeffer (Ho et al., 2002), Mat  (Goldenberg et al., 2004), konserviertem Essen und die Exposition gegenüber Holzstaub (Yu et al., 2002), sowie schlechte Mundhygiene (Guha et al., 2007) und radioaktive Strahlung (Preston-Martin et al., 1988) eine Rolle.

#### 1.3.1 Tabak als Risikofaktor

Mehr als 75% aller Tumore des Kopf-Hals-Bereiches sind mit dem Konsum von Tabakprodukten und/oder Alkohol in Verbindung zu bringen. (Blot et al., 1988)

Hashibe et al. untersuchten 2007 welcher der beiden Faktoren den größeren Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hätte. Dazu testeten sie zwei verschiedene Gruppen. Die erste Gruppe bestand aus Personen, die regelmäßig Tabak konsumierten aber keinen Alkohol tranken; umgekehrt bestand die zweite Gruppe aus Personen, die Alkohol tranken aber keinen Tabak zu sich nahmen. Hashibe et al. fanden heraus, dass es bei dem Konsum von Tabak einen klaren Dosis-Wirkungs Zusammenhang gab. So spielten die Menge, die Dauer und die Anzahl der “Packyears“ (= pro Tag gerauchte Zigarettenpackungen × Anzahl Raucherjahre) eine wichtige Rolle. Bei dem Einfluss von Alkohol konnte ein Zusammenhang nur gefunden werden, wenn Alkohol in großen Mengen konsumiert wurde. Die Studie zeigte, dass 24% der Kopf-Hals-Tumore mit dem Konsum von Tabak, jedoch nur 7% mit dem Konsum von Alkohol in Verbindung gebracht werden konnten.

Des Weiteren fanden Hashibe et al. heraus, dass die Tumore, welche auf den Konsum von Alkohol zurückzuführen waren, sich hauptsächlich im Oro-/ Hypopharynx und Larynx entwickelten.

In einer Studie aus dem Jahr 2009 bestätigte das gleiche Team, dass die Kombination von Tabak und Alkohol den größten Risikofaktor für die Entstehung von Kopf-Hals Tumoren darstellt. Nach dieser Studie zeigten die Exposition gegenüber selektiv Tabak ein ca. 20-fach erhöhtes Risiko und die Exposition gegenüber selektiv Alkohol ein 4-fach erhöhtes Risiko wohingegen die Kombination von beiden Risikofaktoren das Risiko um das ca. 400-fache erhöhte (Hashibe et al., 2009).

Darüber hinaus ist bei Patienten mit einem diagnostizierten Tumor, des Hals-Kopf Bereiches die Überlebensrate geringer, wenn diese den Konsum von Tabakprodukten fortführen (van Imhoff et al., 2015).

## **1.4 Die elektronische Zigaretten (E-Zigarette)**

1963 reichte H. A. Gilbert ein Patent für eine “rauchfreie nicht-Tabak Zigarette“ ein. Er beschrieb ein vermeintlich sicheres und harmloses Gerät, bei dem das Verbrennen von Tabak und Papier durch die Bereitstellung warmer, feuchter und aromatisierter Luft ersetzt werden sollte. Luft sollte durch eine Art Schwamm fließen, der zuvor befeuchtet und aromatisiert wurde. Anschließend sollte die aromatisierte Luft auf die Temperatur von Zigarettenrauch erhitzt werden. Ebenso beschrieb H. A. Gilbert die Möglichkeit, mit diesem Gerät angewärmte Medikamente inhalativ in die Lunge zu verabreichen (Gilbert, 1965).

Ganz ähnliche Aufgaben soll eine E-Zigarette auch heute erfüllen. Dem Verwender soll oral Nikotin, meistens in aromatisierter Form, zugeführt werden, ohne dabei Tabak zu verbrennen. Der große Vorteil soll in einem zigarettenähnlichen Effekt bestehen, der auch die Rauchbildung miteinschließt,

ohne jedoch die schädlichen Beiprodukte, die bei der Verbrennung von Tabak entstehen würden, zu produzieren (Solanki et al., 2014).

### 1.4.1 Aufbau und Funktionsweise einer elektronischen Zigarette

Der Grundaufbau einer elektronischen Zigarette ist bei allen Modellen ähnlich. Die wesentlichen Bestandteile sind das Mundstück, ein Liquid-Tank, ein Verdampfer sowie eine Steuereinheit mit einem Akku.

In dem Verdampfer ist eine Heizwendel verbaut, welche aus einer Trägersubstanz (z.B. Glasfaser) besteht, welche mit einem Draht umwickelt ist. Ein Docht für die Trägersubstanz ragt in den Liquid-Tank und führt zu einer Fortleitung des Liquids vom Tank in den Verdampfer. Wird die elektronische Zigarette eingeschaltet, wird die Heizwendel erhitzt, was zum Vaporisieren des Liquids führt. Sobald an dem Mundstück gesogen wird, strömt durch Öffnungen Umgebungsluft in das Gehäuse und transportiert das vaporisierte Liquid über das Mundstück nach außen. Die folgende Abbildung (Abb. 3) zeigt den schematischen Aufbau einer elektronischen Zigarette.

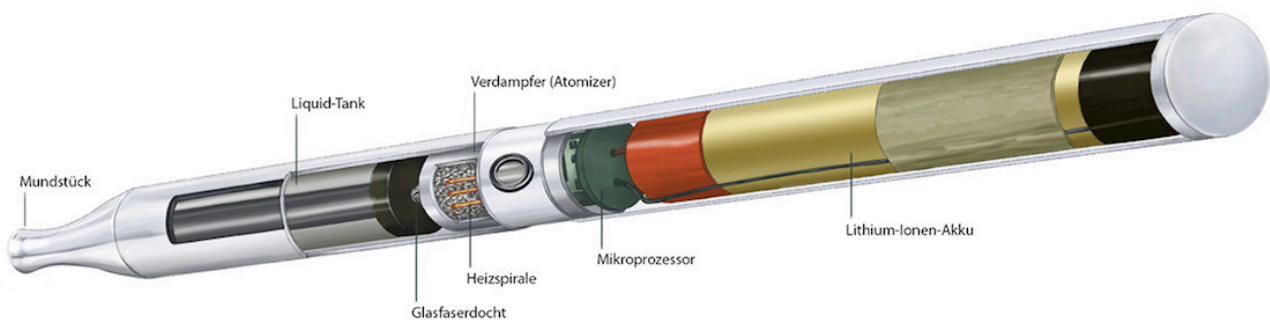


Abb. 3      Aufbauschema einer elektronischen Zigarette (InnoCigs, 2019).

Zurzeit gibt es drei verschiedene Modelle von E-Zigaretten (Abb. 4.):

1. Generation:

Die Modelle der ersten Generation sollen in Form und Aussehen eine herkömmliche Zigarette nachbilden. Die Liquide werden, in Form zuvor gefüllter Kartuschen in die E - Zigarette gegeben, die Energieträger sind kleine Lithium-Akkumulatoren.

2. Generation:

E-Zigaretten der zweiten Generation zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Akkumulatoren eine wesentlich höhere Kapazität besitzen und dass sie erneut mit verschiedenen Liquiden gefüllt werden können. Ein weitere Eigenschaft besteht in der Möglichkeit, den Kopf des Verdampfers separat zu wechseln.

3. Generation:

Geräte der dritten Generation, sogenannte Mods (modifications), ermöglichen es dem Konsumenten, eine Reihe von Einstellungen persönlich vorzunehmen. So können etwa die Spannung (Volt), die Stromstärke (Watt) und der Widerstand (Ohm) des Verdampfers selbst eingestellt werden, wodurch die Menge und Intensität des Dampfes reguliert werden kann.

(Dawkins et al. 2013)

1. Generation



2. Generation



3. Generation



Abb. 4 Beispielabbildung der 3 Generationen von E-Zigaretten nach Dawkins (2013)

## **1.4.2 Liquide**

Das Liquid ist, neben der Zündspule des Verdampfers, die einzige Substanz in einer elektronischen Zigarette die sich verbraucht und ausgetauscht werden muss. Liquide bestehen meist aus Propylenglycol, Glycerin, Aromastoffen, Nikotin und Wasser in jeweils verschiedenen Konzentrationen (Cobb et al., 2015).

Liquide werden in verschiedenen Nikotinstärken und zahlreichen Geschmacksvariationen vertrieben. Für diese Arbeit haben wir uns für Liquide einer der führenden Marken in Deutschland (happy liquid) mit einer Nikotinmenge von 12mg/ml (=1,2% Nikotin) entschieden. Es wurden drei unterschiedliche Geschmacksrichtungen untersucht, wobei die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe bei den verschiedenen Liquiden unterschiedlich war.

## **1.4.3 Propylenglykol und Glycerin**

Propylenglykol (PG) und/oder Glycerin (G) sind wesentliche Bestandteile der Liquide von E-Zigaretten. Es ist bekannt, dass beide Substanzen die oberen Atemwege reizen können (ENVIRON, 2001). Kontakt mit Glykolnebel kann darüber hinaus zum Austrocknen von Schleimhäuten führen (Raymon, 2001). Aus einer Studie aus dem Jahr 2012 ging hervor, dass weder G noch PG zytotoxischen Effekte im direkten Kontakt mit menschlichen embryonalen Stammzellen, neuronalen Stammzellen der Maus oder menschlichen Lungenfibroblasten auslösten (Bahl, et al., 2012).

Propylenglykol (1, 2-Propandiol) (Abb. 5) ist eine organische Verbindung, die als Arzneimittel-lösungsmittel, Lebensmittelzusatzstoff, als Feuchtigkeitsspender in Arzneimitteln, Kosmetika und Tabakprodukten, sowie in Nebelmaschinen verwendet wird (Lim et al., 2014).

Obwohl PG durch die Food and Drug Administration (FDA) als "generell sicher" eingestuft wurde (FDA, 2010), gibt es Fälle, in denen Nebenwirkungen nach topischer, oraler und intravenöser Verabreichung aufgetreten sind. Es zeigen sich ZNS-Toxizität, Hämolyse, Herzrhythmusstörungen und Laktatazidose. Daten zu den Folgen von forcierter Inhalation von PG existieren derzeit jedoch nicht. (Fligner et al., 1985; Martin et al., 1979; Arulanantham et al., 1978; Glasgow et al., 1983; Tuohy et al., 2003; Kelner et al., 1985; O'Donnel et al., 2000).

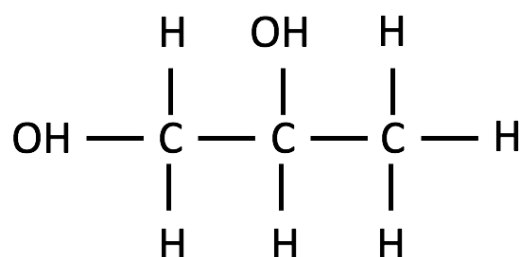


Abb. 5 Strukturformel von Propylenglykol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ )

Glycerin (1,2,3-Propantriol) (Abb. 6) ist ein einfacher trivalenter Alkohol (Roger et al., 1992; Nwachukwu et al., 1012). Es wird in größeren Mengen bei der Veresterung von pflanzlichen Ölen und tierischen Fetten produziert (Solomon et al., 1995; Barbirato et al., 1997; Colion et al., 2001) und hat einen breiten Anwendungsbereich, zum Beispiel als Zusatzstoff in Nahrungsmitteln und Getränken, Kosmetika, Plastik, Tabak, Textilien und Pharmazeutika (Choi et al., 2008; Nicol et al., 2012; Rossi et al., 52-54).

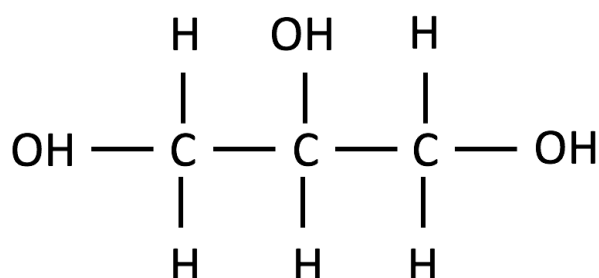


Abb. 6 Strukturformel von Glycerin ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )

#### 1.4.4 Nikotin

Nikotin (Abb. 7) ist ein in der Tabakpflanze natürlich vorkommendes Alkaloid. Nikotin wird durch die Atemwege, die Haut, die Schleimhäute und den Magen-Darm-Trakt absorbiert. Eine Exposition gegenüber Nikotin kann Schwindel, Übelkeit oder Erbrechen verursachen (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Der Ausschuss für Risikobewertung (RAC) der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) hat die Einstufung für Nikotin auf die Kategorie 2: akute Toxizität bei sowohl oraler, als auch dermalen oder inhalativer Aufnahme geändert. Akute Toxizität der Kategorie 2 bedeutet, dass akute Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt und Einatmen bestehen kann (RAC, 2017).

In der Auflistung der Wiley Library der maximale Arbeitsplatz-Konzentrationswerte (MAK) aus dem Jahr 2012 liegen keine Daten vor, nach denen einer chronischen inhalativen Nikotin - Exposition am Menschen oder am Tier ein MAK-Wert zugesprochen werden kann. Ebenso kann Nikotin kein mutagenes oder kanzerogenes Potential zugesprochen werden. Lediglich ein klastogenes Potential (Möglichkeit der Chromosomenaberration) kann nicht ausgeschlossen werden. Somit liegen keine Daten vor, die eine Einstufung in eine Kategorie mit Keimzellmutagenität begründen würden (Wiley Library 2012).

Da die Nikotinkonzentration von E-Liquiden stark variiert und auch hohe Konzentrationen verfügbar sind, können E-Liquide ein erhöhtes Risiko im Hinblick auf die Nikotin-Toxizität darstellen (Ordóñez et al., 2013).

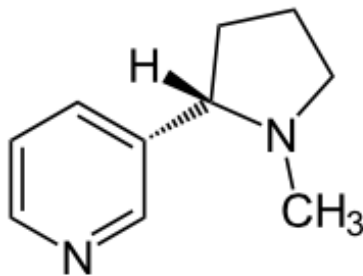


Abb. 7 Strukturformel von Nikotin (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)

## 1.5 Aktuelle Gesetzeslage

In Umsetzung der Richtlinie 2014/40/EU des Europäischen Parlaments und Rates vom 3. April 2014 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Herstellung, die Aufmachung und den Verkauf von Tabakerzeugnissen und verwandten Erzeugnissen wurde in Deutschland im April 2016 das Gesetz über Tabakerzeugnisse und verwandte Erzeugnisse (Tabakerzeugnisgesetz) verabschiedet. Dieses enthält in seinen Paragraphen 13 ff. Regelungen zu elektronischen Zigaretten und Nachfüllbehältern.

In § 13 Abs. 1 heißt es unter anderem, dass Elektronische Zigaretten und Nachfüllbehälter nur in den Verkehr gebracht werden dürfen, wenn

- bei der Herstellung der zu verdampfenden Flüssigkeit nur Inhaltsstoffe von hoher Reinheit verwendet werden, wobei bis auf technisch unvermeidbare Spuren keine anderen Stoffe als diese reinen Inhaltsstoffe enthalten sein dürfen, und



- bei der Herstellung der zu verdampfenden Flüssigkeit außer Nikotin nur Inhaltsstoffe verwendet werden, die in erhitzter und nicht erhitzter Form kein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen.

Die zu dem Gesetz erlassene Rechtsverordnung (Tabakerzeugnisverordnung von 27.04.2016) enthält unter anderem Mitteilungsverpflichtungen zu den Inhaltsstoffen in elektronischen Zigaretten sowie Nachfüllbehältern und regelt, dass Vitamine, Koffein und Taurin, welche einen positiven Eindruck beziehungsweise einen gesundheitlichen Nutzen, sowie eine Assoziation von Energie und Vitalität vermitteln könnten, darin nicht enthalten sein dürfen. Die nikotinhaltigen zu verdampfenden Flüssigkeiten dürfen einen Nikotingehalt von höchstens 20mg/ml haben. Liquide für E-Zigaretten, (auch ohne Nikotin) dürfen an Personen unter 18 Jahren nicht mehr verkauft werden. Das gesetzliche Verbot schädlicher Inhaltsstoffe bietet Veranlassung die im Markt verfügbaren Liquide auf ihre Auswirkungen zu untersuchen (BMEL, 2017).

### **1.5.1 Aktuelle Untersuchungen / Problematik**

Das deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) veröffentlichte 2014 eine Stellungnahme zur kontroversen Diskussion um E-Zigaretten auf Basis von wissenschaftlichen Studien. Eine Hauptaussage der Stellungnahme ist die Einstufung der E-Zigarette-Liquide und der einzelnen Komponenten als gesundheitlich bedenklich, wobei auch eine Langzeitgefährdung bei fehlender Datenlage nicht auszuschließen sei. Die oft angepriesene Rauchentwöhnung oder ein Rauchstopp durch E-Zigaretten wird durch das Aufrechterhalten des Rauchrituals in Frage gestellt, darüberhinaus wird die Frage aufgeworfen, ob E-Zigaretten durch die Vermarktung als Lifestyle-Produkt die Tabakprävention untergraben und zu einer Verharmlosung führen (DKFZ, 2014).

Darüberhinaus sind E-Zigaretten noch weitestgehend unreguliert. Die Vermarktung über das Internet und die damit zusammenhängende erschwerte Rückverfolgbarkeit von Material und Inhaltsstoffen sind risikoe erhöhende Faktoren (Zhu et al., 2014).

### **1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

E-Zigaretten werden weltweit millionenfach benutzt und werden als eine gesündere Alternative gegenüber herkömmlichen Zigaretten vermarktet. Sie werden zur Rauchentwöhnung, als Alternative zu Zigaretten, aber auch als Einstieg in den Tabakkonsum verwendet. In dieser Arbeit wurde sich mit

der Frage beschäftigt, ob die in elektronischen Zigaretten verwendeten Liquide und deren Bestandteile zyto- und/oder genotoxischen Einflüsse auf gesunde Schleimhautzellen haben. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Liquide sowie deren Trägersubstanzen getestet. Alle drei Liquide und die Bestandteile der Basisliquide sind frei im Handel erwerblich. Sie weisen unterschiedliche Zusammensetzungen der Grundsubstanzen auf. Um den Ursprung der Toxizität bestimmen zu können, wurden sowohl die Liquide als auch die Trägersubstanzen (Propylenglycol und Glycerin) in den in dem jeweiligen Liquid vorkommenden Konzentrationen untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit, ist es, eine Aussage zu potentiell kanzerogenen Effekten von E-Liquiden im Bereich des Oropharyngs zu treffen. Zu diesem Zwecke wurden zytotoxische und genotoxische Wirkungen ausgewählter E-Liquide auf Kulturen entsprechender Schleimhautzellen in vitro analysiert.

## 2. Methoden und Material

### 2.1 Schematische Darstellung der durchgeführten Versuche

Die folgende Abbildung (Abb.8) zeigt den schematischen Versuchsaufbau, von der Gewinnung der Proben bis zu den abschließenden Testverfahren.

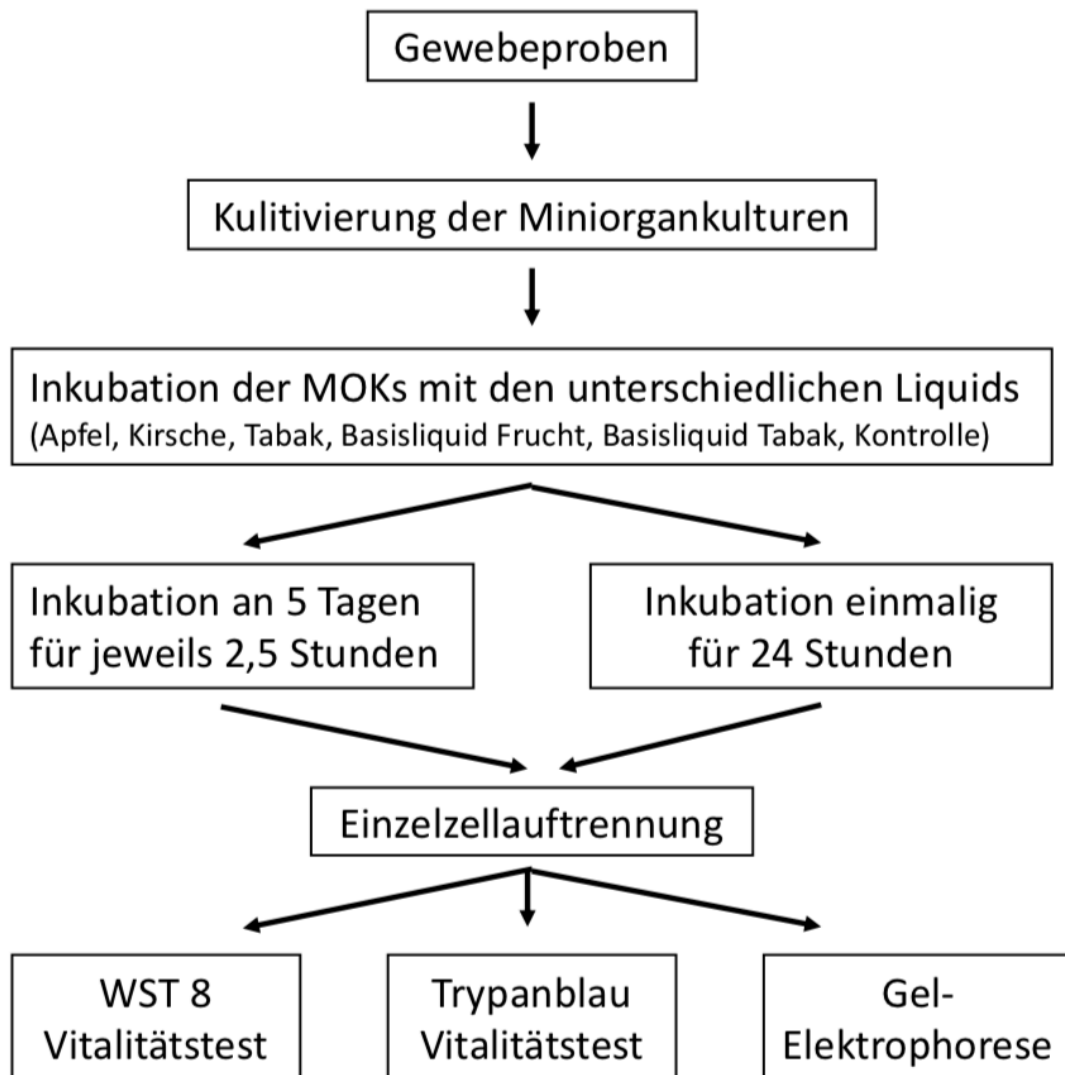


Abb. 8 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

## **2.2 Gewebeproben und Patientenkollektiv**

Das in der Versuchsanordnung benutzte Gewebe besteht aus oropharyngealer Schleimhaut, welche aus Tonsillektomie-Operationen von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals,- Nasen,- und Ohrenheilkunde der LMU in dem Krankenhaus Großhadern gewonnen wurde.

Die Indikationen zur operativen Entfernung der Gaumenmandel wurden bei den Patienten auf Grund einer Hyperplasie der Gaumenmandel oder einer chronischen Tonsillitis gestellt.

Das Patientenkollektiv umfasst 30 Patienten, wobei alle Versuchsreihen mit n=20 von jeweils verschiedenen Patienten durchgeführt wurden. Probengrößenbedingt konnten nicht immer alle Versuchsreihen mit dem Gewebe eines Patienten durchgeführt werden. Vereinzelt verworfene Proben, durch z.B. Bakterienbefall wurden nicht weiter berücksichtigt. Das Alter der Patienten betrug 18-51 Jahre mit einem Altersdurschnitt von 30,2 Jahren, wobei 56% der Patienten männlich und 44% der Patienten weiblich waren. Da es in Versuchsreihen keine erkenntlichen intraindividuellen Unterschiede bezüglich Alter und Geschlecht gab, wird im Verlauf darauf kein Bezug genommen.

Die Gewebeproben wurden während der Eingriffe aus dem Rachenbogen gewonnen und anschließend in 0,9% NaCl Lösung für maximal 3 Stunden aufbewahrt, in dieser Zeit fanden der Transport in das Labor und die weitere Behandlung des Gewebes statt.

Sämtliche Patienten wurden vor der Operation über die anschließende wissenschaftliche Weiterverwendung ihres Gewebes aufgeklärt. Der für Zwecke dieser Arbeit gestellte Ethikantrag mit der Nr. 221/04 wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität geprüft und genehmigt.

## **2.3 Miniorgankulturen (MOK)**

1991 berichteten Steinsvag et al. erstmals über Miniorgankulturen. Es wurden Teile von humanen adenoiden Geweben benutzt, welche in nichtadhäsive, stationäre Organkulturen umgewandelt wurden. Nach einer Kultivierungsdauer von 40 Tagen wurden an der Oberfläche der Fragmente schlagende Zilien beobachtet. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Oberfläche der Fragmente mit einem mehrschichtigen, zilientragenden Epithel mit Basalmembran bedeckt waren. Steinsvag et al. schlussfolgerten, dass die kultivierten Gewebsfragmente als Organkulturmodell für normale respiratorische Mukosa benutzt werden können (Steinsvag et al., 1991). Später konnte das Modell zur Simulation von potentiellen Noxen auch auf nicht-zilientragendes adenoides Gewebe

ausgeweitet werden. So verwendete Hartmann oropharyngeales Gewebe zur erfolgreichen Synthese und Anwendung von Miniorgankulturen (Hartmann, 2009).

In einem Versuchsaufbau von 2001 griffen Kleinsasser et al. das Modell auf. Es war Ihnen möglich Miniorgankulturen aus nasaler Schleimhaut mehrmals mit Xenobiotika zu versetzen. Sie konnten plausibilisieren, dass Versuche mit Miniorgankulturen eine bessere Vergleichbarkeit zu in vivo Versuchen haben, als Versuche, die auf der Kultivierung von Einzelzellen basieren. (Kleinsasser et al., 2001).

Ein großer Vorteil dieses dreidimensionalen Modells besteht darin, dass eine mehrmalige Exposition gegenüber potentiell gefährlichen Substanzen möglich ist, da es über einen signifikanten DNA-Reparaturmechanismus verfügt. Das Modell stellt sich in-vivo-nah dar und zeigt sich für genotoxikologische, zytologische und immunologische Untersuchungen als geeignet. (Wallner et al., 2005).

## **2.4 Vorbereitung der 24-Well-Platten**

Zur Reifung der Miniorgankulturen und zur Durchführung der Versuche wurden 24-Well-Platten verwendet. Um ein optimales Wachstum der Miniorgankulturen auf den 24-Well-Platten zu gewährleisten und um die Adhäsion der Miniorgankulturen an die 24-Well-Platte zu verringern, wurden die Platten zuvor beschichtet. Hierfür wurden 0,45g Agarosepulver in 30ml Aqua bidestillata erhitzt, der flüssigen Agarose wurden anschließend 6ml fötales Kälberserum (FCS), 30ml steril filtrierte Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 75µl nicht essentielle Aminosäuren, 120µl Amphotericin B und 240µl Streptomycin-Penicillin Lösung zugeführt. Anschließend wurden mit einer Multipipette je 250µl auf jedes Well einer 24-Well-Platte gegeben. Um ein vollständiges Aushärten der Agarose zu gewährleisten, wurden die behandelten 24 Well-Platten für mindestens 12 Stunden in einem Kühlschrank aufbewahrt.

## **2.5 Weiterbehandlung der Schleimhautproben**

Die aus den Operationen gewonnenen Schleimhautproben wurden im Labor unter sterilen Bedingungen zu Miniorgankulturen weiterverarbeitet. Zu diesem Zweck wurden die Proben jeweils auf eine Petrischale gegeben und mit einem Skalpell makroskopisch von allem nichttonsillären Gewebe befreit. Während dieser und aller weiteren Schritte wurden die Proben, um einen Schaden durch Auszutrocknen zu verhindern, mit 0,9% NaCl Lösung feucht gehalten. Anschließend wurden die

Proben in ca. 1mm<sup>3</sup> große Würfel geschnitten und gereinigt. Die Reinigung erfolgte durch drei mit je 5ml Phosphate-Buffered-Saline (PBS) gefüllte Gefäße, in welche die Mukosastücke nacheinander gegeben wurden. Im Anschluss wurden die Proben auf eine vorbereitete 24-Well-Platte aufgebracht. In jedes Well wurden 2-3 Mukosastücke gegeben, als Nährmedium wurden 250µl Bronchial-Epithelial-Growth-Medium (BEGM) dazu pipettiert (Abb. 9).

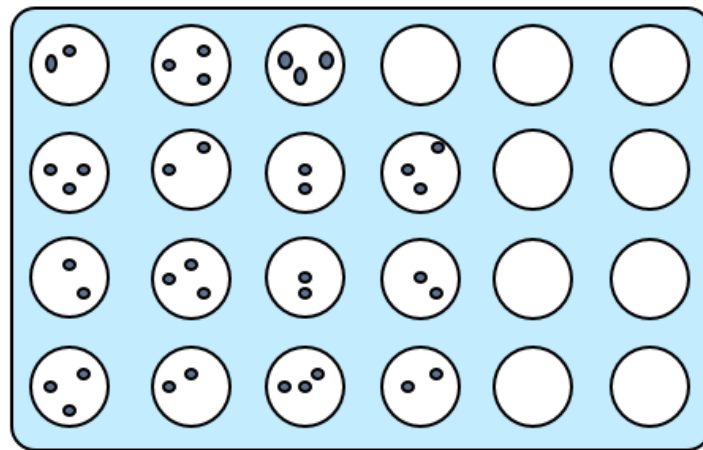


Abb. 9 24-Well-Platte mit 2-3 Mukosastücken in dem jeweiligen Well.

## 2.6 Kultivierungsphase

Die 24-Well-Platten mit den Miniorgankulturen wurden zur Kultivierung in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 100% für drei bis vier Wochen bebrütet. Die Kulturen wurden dreimal wöchentlich mit frischem Nährmedium (BEGM) versorgt. Bevor das neue Medium in die Wells gegeben wurde, wurde das verbrauchte Medium, in welchem auch abgeschilferte Schleimhautzellen und Erythrozyten enthalten waren, mit einer Pipette jeweils vollständig abgesaugt und verworfen.

Alle sieben Tage wurden die 24-Well-Platten gewechselt, d.h. die Miniorgankulturen wurden auf eine frische 24-Well-Platte gegeben und erneut mit 250µl Nährmedium bedeckt.

Während der Kultivierungsphase wurden die Miniorgankulturen täglich mit einem inversen Mikroskop untersucht; dies diente der frühzeitigen Erkennung von Infektionen mit Pilzen oder Bakterien. Bei einem Befall wurden ein dreimaliger Mediumwechsel pro Tag über 3 Tage, ein

Wechsel der 24-Well-Platte sowie mehrmalige mikroskopische Kontrolluntersuchung durchgeführt. Wenn der Befall sich dadurch nicht hat eindämmen lassen, wurde die Probe verworfen.

Die Untersuchungen mit dem Mikroskop dienten auch der Begutachtung des Fortschreitens der Epithelialisierung. Die vollständige Epithelialisierung dauerte 3-4 Wochen und war abgeschlossen, wenn die Schleimhautzellen rundherum von einer geschlossenen Schicht unverhornten Plattenepithels umgeben waren (Abb. 10).

Die “reifen“ Miniorgankulturen wurden im Anschluss mit den zu testenden Liquiden inkubiert.

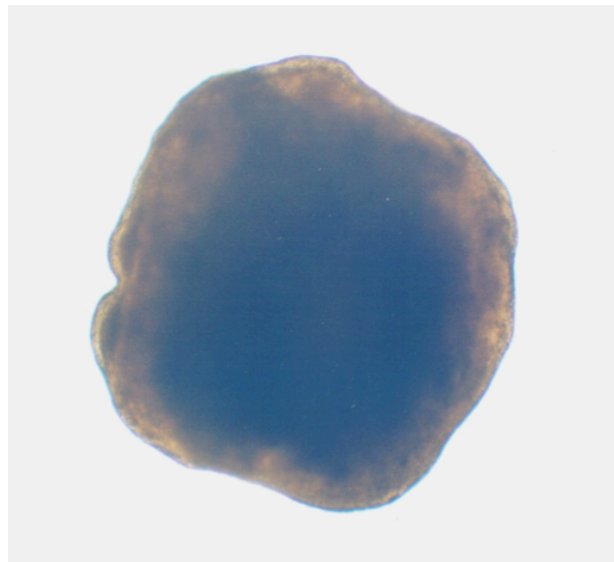


Abb. 10      Mikroskopische Fotografie einer “reifen“ Miniorgankultur Vergrößerung 40-fach.

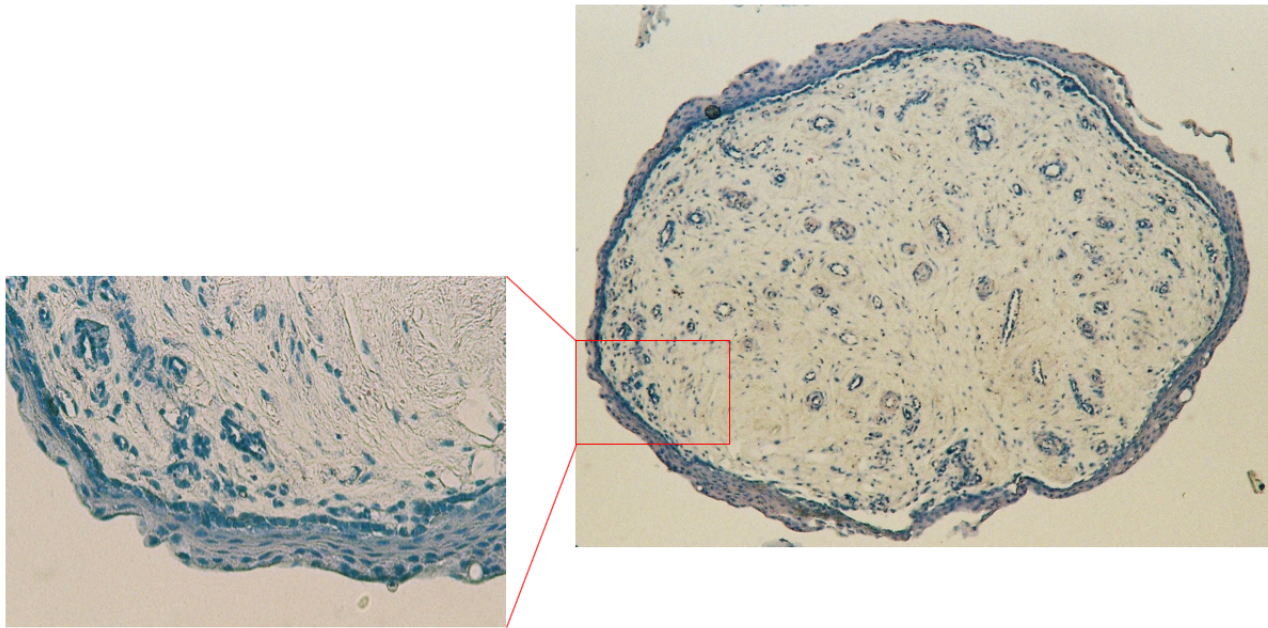


Abb.11 Histologischer Schnitt einer „reifen“ Miniorgankultur in HE-Färbung (Hartmann, 2009)

## 2.7 Inkubation der Miniorgankulturen mit den verschiedenen Liquiden

In dem Versuchsaufbau der vorliegenden Studie wurden Fertigliquide der Happy Liquid GmbH (München, Deutschland), sowie deren Basisliquide verwendet. Dabei wurden drei beliebte Aromazusätze nämlich Tabak, Kirsche und Apfel untersucht. Die Zusammensetzungen der Liquide zeigt leichte Unterschiede. Die Zusammensetzung der Fruchtliquide (FL), Kirsche (K) und Apfel (A) besteht aus 80% Propylenglykol, 10% Glycerin und 10% Wasser. Die Zusammensetzung des Tabakliquid (T) besteht aus 20% Propylenglykol, 60% Glycerin und 20% Wasser. Alle verwendeten Liquide weisen eine Nikotinkonzentration von 12mg/ml auf. Die Zusammensetzung und die Bestandteile der Aromastoffe konnte, auch nach Rückfrage bei dem Hersteller, nicht geklärt werden. Unabhängig von den drei o.g. Liquiden wurden auch zwei Basisliquide; Fruchtbasis (BF) mit der Zusammensetzung 80% Propylenglykol (Sigma-Aldrich, Inc.; München, Deutschland), 10% Glycerin (Sigma-Aldrich) und 10% Wasser und Tabakbasis (BT) mit der Zusammensetzung 20% Propylenglykol, 60% Glycerin und 20% Wasser untersucht. Diese beiden Basisliquide enthalten weder Nikotin noch Aromastoff. Insgesamt wurden so 5 verschiedenen Liquide untersucht.

Bei Vorversuchen mit den beiden Fruchtliquiden zeigte sich, dass eine Verdünnung der Liquide mit BEGM (siehe 2.5) auf 10%, 15% und 25% notwendig war, um eine ausreichende Vergleichbarkeit zu erzielen. Bei einer Verdünnung von 1:2 zeigte sich bereits eine extrem starke Toxizität, mit der ein differenzierter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich gewesen wäre.



In dem Versuchsaufbau der vorliegenden Studie wurden die Miniorgankulturen mit den fünf verschiedenen Liquiden in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Auf jeder 24-Well-Platte wurde ein Liquid in 10-prozentiger, 15-prozentiger und 25-prozentiger Konzentration in drei verschiedenen Versuchsaufbauten getestet (siehe Abb. 12). Um die verschiedenen Konzentrationen zu erreichen, wurde jedes Liquid mit BEGM in entsprechender Menge vermischt und mit Hilfe eines Vortex vermischt.

In jedes Well mit Miniorgankulturen wurden 250µl des entsprechenden Liquidgemisches oder der Negativkontrolle (BEGM) gegeben. Dabei gab es zwei verschiedene Ansätze:

#### **Ansatz 1 (rep.)**

Für den Versuchsaufbau 1 wurde für eine Dauer von 2,5 Stunden pro Tag über 5 aufeinanderfolgende Tage mit dem jeweiligen Liquid in der entsprechenden Konzentration bzw. der Negativkontrolle inkubiert. Diese repetitive Gabe soll möglichst realitätsnahe Bedingungen mit wiederholtem Gebrauch von elektronischen Zigaretten über mehrere Tage simulieren. Nach Ablauf der 2,5 Stunden wurde die Mischung abpipettiert und die Miniorgankulturen wurden zweimal mit je 250µl BEGM gewaschen. Abschließend wurde erneut 250µl BEGM in die Wells gegeben. Dieser Vorgang wiederholte sich an jedem der 5 Tage.

#### **Ansatz 2 (24)**

Für Versuchsaufbau 2 wurden die Miniorgankulturen lediglich einmalig über einen Zeitraum von 24 Stunden mit dem jeweiligen Liquid in entsprechender Konzentration bzw. mit der Negativkontrolle inkubiert.

Die Messungen der Genotoxizität (2.11) und die Vitalitätstest mit Trypan-Blau (2.9), wurden mit Zellen aus beiden Versuchsaufbauten durchgeführt. Für die WST-8 Vitalitätstests (2.10) wurden ausschließlich Zellen aus Versuchsaufbau 2 (d.h. mit Inkubation über 24 Stunden) verwandt.

Nach der letzten Inkubation über 2,5 Stunden in Versuchsaufbau 1 und der 24 stündigen Inkubation in Versuchsaufbau 2 wurden die Miniorgankulturen für Zwecke der Untersuchung jeweils in Einzelzellen aufgetrennt.

Zur Inkubation wurden die Miniorgankulturen jeweils auf eine neue, nach dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Schema vorbereitete 24-Well-Platte gegeben und nach dem auf Abbildung 12 zu sehendem Schema behandelt.



Abb. 12 Anordnungsschema für die Inkubation der Miniorgankulturen.

Legende zu Abbildung 12:

Kw	Kontrolle für WST-8 Vitalitätstest		Kc	Kontrolle für Comet-Assay
Kt	Kontrolle für Trypanblau Vitalitätstest			
10% 24	Liquid in 10%- Konzentration für einmalig 24 Stunden		15% 24	Liquid in 15%- Konzentration für einmalig 24 Stunden
25% 24	Liquid in 25%- Konzentration für einmalig 24 Stunden			
10% rep	Liquid in 10%- Konzentration für 5 mal 2,5 Stunden		15% rep	Liquid in 15%- Konzentration für 5 mal 2,5 Stunden

## 2.8 Einzelzellauftrennung

Für die Einzelzellauftrennung wurde ein Enzymgemisch benötigt, in welches die Miniorgankulturen gegeben wurden. Das Enzymgemisch bestand aus 50mg Protease, 10mg Collagenase P und 10mg Hyaluronidase, welche mit einer Feinwaage abgemessen und in 10ml BEGM gelöst wurden. Anschließend wurde das Gemisch durch einen Polypropylenfilter (Porendurchmesser 0,22µm) steril filtriert.

Die Einzelzellauftrennung erfolgte in 1,5ml Mikroreaktionsgefäßen der Firma Eppendorf<sup>TM</sup>, welche vor der Verwendung beschriftet wurden. Je 500µl des Enzymgemisches wurden in jedes der beschrifteten Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Miniorgankulturen wurden ein letztes Mal von dem Liquid gereinigt. Anschließend wurden die Miniorgankulturen eines Wells in das jeweilige Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Gefäße mit Enzymgemisch und Miniorgankulturen wurden für 45 Minuten in einem Schwenkwasserbad bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der 45 Minuten wurden die Eppendorf Gefäße aus dem Wasserbad geholt und auf einem Vortex für 15-20 Sekunden geschüttelt; dieser Schritt diente der Trennung von Schleimhaut- und Bindegewebszellen. Da die Bindegewebszellen in diesem Versuchsaufbau nicht näher untersucht wurden, wurden diese mit Hilfe einer sterilen Kanüle aus den Eppendorf Gefäßen entfernt und verworfen.

Um die Aktivität der nun nicht mehr benötigten Enzyme zu verringern, wurden in jedes der Mikroreaktionsgefäße 500µl 4°C kaltes fötales Kälberserum (FCS) gegeben, zusätzlich wurden die Gefäße von außen mit Eis gekühlt. Die Gefäße wurden im Anschluss in einer Zentrifuge mit einem Rotationsdurchmesser von 42,2cm für 5 Minuten bei 800 rpm und 4°C zentrifugiert.

In Folge der Zentrifugalkraft sammelten sich die Einzelzellen am Boden des Eppendorf Gefäßes in einem Zellpellet. Nach Abschluss des Zentrifugierens wurden die Gefäße erneut von außen mit Eis gekühlt und aus jedem Gefäß 1000µl des Flüssigkeitsgemisches abpipettiert. Bei diesem Arbeitsschritt musste besonders darauf geachtet werden, lediglich die Flüssigkeit, jedoch nicht das oft nicht gut sichtbare Zellpellet am Boden des Gefäßes mit abzusaugen. In jedes Eppendorf Gefäß wurde, um die Schleimhautzellen von dem Enzymgemisch zu reinigen, 1000µl PBS resuspendiert und das Gefäß erneut bei 800 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Nachdem die Gefäße ein letztes Mal zentrifugiert wurden und der Überstand abpipettiert wurde, wurden die Gefäße mit den nunmehr gereinigten Zellpellets entweder der Vitalitätsbestimmung mit Trypan-Blau, der Vitalitätsbestimmung mit WST-8 oder der Gelelektrophorese zugeführt.

## **2.9 Vitalitätsbestimmung Trypan-Blau**

Die Vitalitätsbestimmung mit Trypan-Blau erlaubt eine Einschätzung der Vitalität aller betrachteten Zellen. Für die Auszählung der Zellen wurden eine Neubauer-Zählkammer und ein Mikroskop (400x Vergrößerung) verwendet.

Trypan-Blau ist ein Farbstoff, der durch Schäden der Zellmembran in das Innere der Zelle gelangt und somit auf eine veränderte Membrandurchlässigkeit schließen lässt. Reichert sich eine Zelle mit dem Farbstoff an, so ist dies ein Zeichen für eine Schädigung der Zelle.

Mit dem Mikroskop werden die Zellen auf Farbänderungen untersucht: Färbt sich eine Zelle nicht an, so ist diese als vital zu werten; ist eine bläuliche Farbänderung in der Zelle zu sehen, so ist von einer Membranschädigung auszugehen und diese Zelle als avital zu werten.

Zur Vitalitätsbestimmung mit Trypan-Blau wurde, im Anschluss an die Einzelzellisolierung, je ein Zellpellet aus jeder Versuchsreihe untersucht. Hierzu wurden 50µl Trypan-Blau zu dem Zellpellet in das Mikroreaktionsgefäß gegeben und diese durch vorsichtiges Schwenken miteinander vermischt. Die Zellsuspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht und mit einem Phasenkontrastmikroskop unter 400x Vergrößerung ausgewertet. Es wurden die Anzahl der vitalen und der avitalen Zellen in einem der quadratischen Zählkästchen bestimmt und die Vitalität errechnet. Die Vitalität entspricht dem prozentualen Anteil der gesunden Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen in einem Abschnitt der Zählkammer (Abb.12) (Phillips et al., 1973). Dazu wird die Zahl aller vitalen Zellen durch die Zahl aller Zellen geteilt und dieser Quotient mit 100 multipliziert.

$$\text{Vitalität \%} = \frac{\text{vitale Zellen}}{\text{vitale} + \text{avitale Zellen}} \times 100$$

Abb. 13      Berechnung der Vitalität nach Phillips et al.

Der Trypan-Blau-Test wurde durchgeführt, um für die anschließenden Comet Assay Untersuchungen (siehe 2.11) zu gewährleisten, dass jeweils ausreichend viele vitale Zellen vorhanden sind, um eine möglichst genaue Differenzierung zu ermöglichen. Zu diesem Zwecke wurde ein Cut-off-Wert der Vitalitätsbestimmung von 80% gewählt. Dieser Wert wurde bei keiner der Proben unterschritten.

## 2.10 Vitalitätsbestimmung mit WST - 8

Die Vitalitätsbestimmung mit WST-8 ist ein kalorimetrischer Test, welcher das Monosodiumsalz WST-8 (2- (2-methoxy-4-nitrophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-disulfophenyl) -2H-tetrazolium) verwendet und, durch die Bestimmung des Anteils an vitalen Zellen, die Zytotoxizität von schädlichen Substanzen auf zellulärer Ebene bestimmt. Das Salz bildet durch intrazelluläre Dehydrogenase das wasserlösliche und gelbliche WST-8-Formazan (Abb. 13). Die Menge des

entstehenden WST-8-Formazans ist direkt proportional zu der Anzahl an vitalen Zellen (Promokin, 2015).

Um miteinander vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Absorbanz zu erhalten, ist es für die Vitalitätsbestimmung mittels WST-8 wichtig, immer die gleiche Anzahl von Zellen zu untersuchen. Da aber jede Miniorgankultur aus einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen besteht, musste die Zellzahl angeglichen werden. Zu diesem Zweck wurde die aus der Einzelzellauftrennung erhaltene Suspension teilweise in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Je nach Anzahl der gezählten Zellen wurde die Suspension in dem Eppendorf Mikroreaktionsgefäß auf 50.000 Zellen/ml verdünnt. Für jede Versuchsanordnung wurden 100 µl der verdünnten Suspension in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. In jedes Well wurden 10 µl der WST-8 Lösung dazu pipettiert und für 24 Stunden in einem Inkubator inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurde die Absorbanz mit einem 450nm Mikroplattenleser gemessen und ausgewertet.

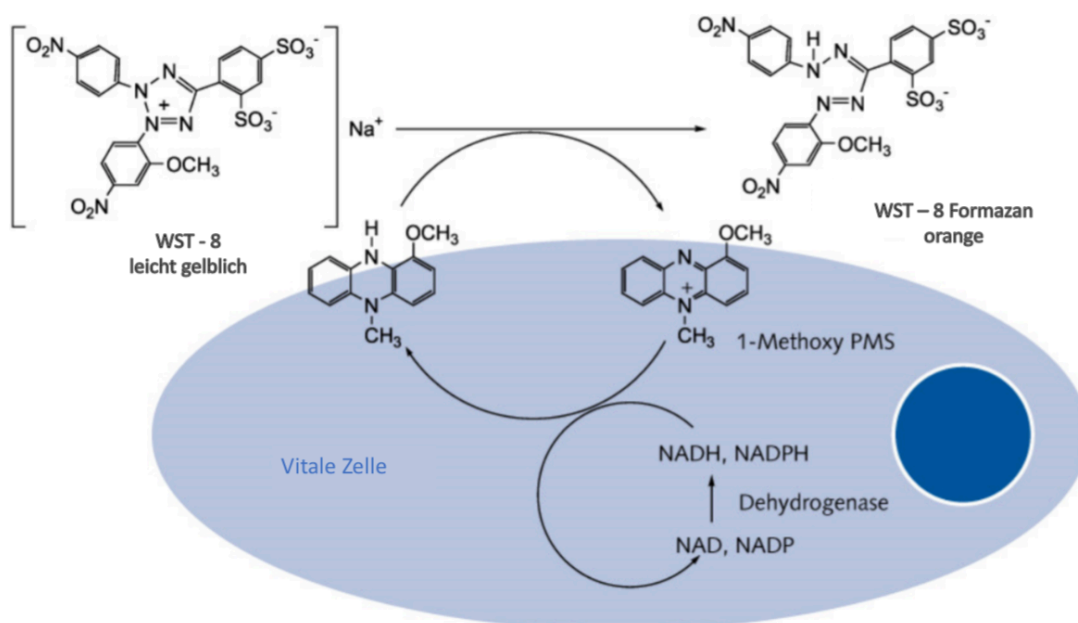


Abb. 14 Transformation von WST-8 in WST-8 Formazan durch Bio-reduktion (Promokine, 2015)

## 2.11 Alkalische Mikrogelelektrophorese/ Comet-Assay

Die in diesem Versuchsaufbau verwendete alkalische Mikrogelelektrophorese ist ein Nachweisverfahren zur DNA-Schädigung, hierbei macht sie sich die Fragmentierung beschädigter DNA zunutze. Zur Quantifizierung des DNA-Schadens wird der Anteil der nach der Elektrophorese “gewanderten” Fragmente sowie der Anteil der im Zellkern verbleibenden DNA bestimmt. Das hierbei entstehende Bild ist “kometenähnlich“, wobei die im Zellkern verbleibende DNA den Kometenkopf und die gewanderten Fragmente den Kometenschweif darstellen. Die Auswertung der Schädigung erfolgte mit dem Analyseprogramm Komet++. Hierbei werden zwei Werte berechnet, die das Ausmaß der Schädigung darstellen.

Der **Olive Tail Moments-Wert (OTM)** ist ein einheitsloser Wert, der das Produkt des Anteils der DNA(-Fragmente) im Schweif und der mittleren Wanderstrecke dieser ins Verhältnis zur gesamten DNA des Zellkerns setzt (Olive, Bannath, 1993).

Der **%DNA/Tail-Wert** misst die relative Fluoreszenzstärke im Kopf und Schwanz des Kometen und setzt diese ins Verhältnis.

Um die Stärke der Schädigung zu quantifizieren, wurde für Zwecke der vorliegenden Studie der %-DNA-Tail Wert verwandt. Der Grund liegt in der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien (Lovell et al., 2008), die ebenfalls diesen Wert nutzen.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Auswertungen mit unterschiedlicher starker Schädigung. Abbildung 14 zeigt einen Zellkern ohne Schädigung, Abbildung 15 zeigt einen Zellkern mit geringfügiger DNA-Schädigung und Abbildung 16 zeigt einen Zellkern mit starker DNA-Schädigung.

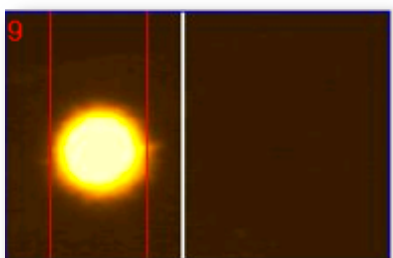


Abb. 15      Auswertung einer mit Ethidiumbromid gefärbten gesunden Schleimhautzelle mittels Comet 6

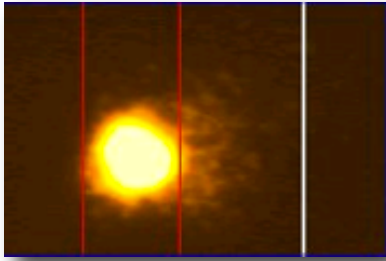


Abb. 16 Auswertung einer mit Ethidiumbromid gefärbten Schleimhautzelle mit leichter Schädigung mittels Comet 6

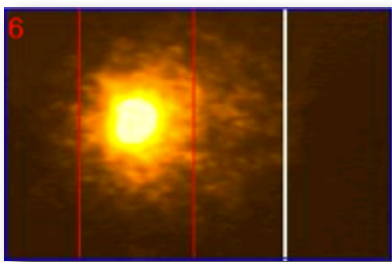


Abb. 17 Auswertung einer mit Ethidiumbromid gefärbten Schleimhautzelle mit starker Schädigung mittels Comet 6

Der Comet Assay wurde erstmalig 1984 durch Oestling und Johanson beschrieben (Oestling und Johanson, 1984). Zum Nachweis genotoxischer Effekte wurde das ursprüngliche Verfahren von Singh et al. und Harréus et al. dahingehend modifiziert, dass auch DNA Crosslinks, inkomplette Exzisionsreparaturstellen, Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen nachgewiesen werden konnten. (Singh et al., 1988; Harréus et al., 1999).

### 2.11.1 Vorbereiten der Objektträger und Lyse der Kern- und Zellmembran

Die auf beiden Längsseiten angerauten Objektträger (24x70mm), die für die Gelelektrophorese benutzt wurden, wurden im Vorfeld mit einem Diamantstift durchnummeriert und jeweils mit 85µl 0,5-prozentiger Agarose beschichtet. Das Beschichten führte zu einer besseren Haftung der Zellen auf dem Objektträger und verringerte den Verlust von Zellen im weiteren Versuchsablauf.

Für die Beschichtung wurde 0,5% Agarose mit Aqua bidest. vermischt, die Mischung wurde in einem Mikrowellengerät erhitzt und mit einer Multipipette auf die Objektträger aufgebracht. Um die

Agarose gleichmäßig auf den Objektträger zu verteilen, wurde ein Deckglas auf die Objektträger mit der noch flüssigen Agarose gelegt. Um das vollständige Aushärten der Agarose zu gewährleisten, wurden die beschichteten Objektträger für mindestens 48 Stunden trocken gelagert.

Nach Aushärten der Agarose wurden die Zellpellets aus der Einzelzellauftrennung auf die Objektträger gegeben. Hierfür wurde der Überstand aus den Eppendorf Mikroreaktionsgefäßen nach der Einzelzellauftrennung bis auf 10µl abpipettiert und das im Gefäß verbleibende Zellpellet mit 75µl Agarose 0,7 % in dem jeweiligen Gefäß vermengt. Anschließend wurde das Gemisch mit einer Pipette auf einen nummerierten und mit Agarose 0,5% beschichteten Objektträger gegeben. Im Anschluss wurde ein Deckglas auf den Objektträger gegeben und der Objektträger für 10 Minuten auf eine gekühlte Oberfläche gelegt. Nach Abschluss der 10 Minuten wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und es wurden 85µl flüssige Agarose 0,5% auf den Objektträger gegeben. Das Deckglas wurde erneut auf den Objektträger gegeben und der Objektträger für weitere 10 Minuten auf eine gekühlte Oberfläche gelegt.

Nachdem das Deckglas endgültig entfernt worden war, wurden die Objektträger in einer Küvette platziert. Die Küvette mit den Objektträgern wurde mit Lysepuffer aufgefüllt und für mindestens eine Stunde und maximal 7 Tage bei 4°C gelagert. Der Lysepuffer bewirkte die Auflösung der Zell- und Kernmembran der Zellen, wodurch die in der Zelle befindliche DNA freigelegt wurde. Die Lyse ist ein essentielles Vorgehen für die anschließende Gelelektrophorese.

### **2.11.2 Durchführung der Gelelektrophorese und Fluoreszenzfärbung**

Für die Gelelektrophorese wurde ein auf 4 °C gekühlter Elektrophoresepuffer benötigt, der einige Zeit im Vorfeld angefertigt wurde. Die Elektrophoresekammer wurde während der Elektrophorese in einem Wasserbad gekühlt und vor der Benutzung mit einer Dosenlibelle waagrecht ausgerichtet.

Die Objektträger aus der Küvette wurden, nach abgeschlossener Lyse, mit einer Pinzette aus der Küvette entfernt und anschließend mit der Agaroseschicht nach oben in die Elektrophoresekammer gelegt, dabei wurde an der Anodenseite begonnen. Nachfolgend wurde die Kammer luftblasenfrei mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt.

Die 20-minütige Inkubation der Zellen in dem alkalischen Elektrophoresepuffer bewirkte die Entspiralisierung und Denaturierung der DNA. Danach wurde die Elektrophorese mit 25V und 300mA für 20 Minuten durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Objektträger auf eine Färbebrücke gelegt und dreimal im Abstand von 5 Minuten mit je 400ml Trisma Base neutralisiert.



Für die Fluoreszenzfärbung wurde, nach abgeschlossener Neutralisierung, auf jeden Objektträger 75µl des Farbstoffes Ethidiumbromid gegeben, um die DNA im Zellkern und die DNA-Fragmente anzufärben. Da der Farbstoff stark lichtsensibel ist, wurde die Färbung in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die gefärbten Objektträger wurden bis zur Auswertung in einem mit feuchtem Papier ausgelegten, lichtundurchlässigem Objektträgerkasten im Kühlschrank gelagert.

### **2.11.3 Digitale Auswertung der DNA-Migration**

Für die Auswertung der DNA Migration wurde ein DMLB Fluoreszenzmikroskop mit 400-facher Vergrößerung mit einer angeschlossenen CCD-Kamera benutzt. Auf jedem Objektträger, auf dem sich mit Ethidiumbromid gefärbte DNA befand, wurden 80 zufällig ausgewählte Zellen ausgewertet. Der Objektträger wurde mäanderförmig nach Zellen abgesucht, wobei darauf geachtet werden musste, dass Zellen aus allen Bereichen der Objektträger ausgewertet wurden. Für die digitale Bildverarbeitung wurde das Programm Komet++ verwendet. Hierbei werden Schädigungen in Form von Strangbrüchen quantifiziert. Bei der Detektion macht man sich das unterschiedliche DNA-Migrationsverhalten zunutze. Je mehr DNA-Strangbrüche vorhanden sind, desto mehr und kleinere DNA-Fragmente sind vorhanden. Da kleine DNA-Fragmente mobiler sind, wandern sie im elektrischen Feld während der Gelelektrophorese weiter als größere Fragmente oder intakte DNA.

### **2.11.4 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Datenanalyseprogramm SPSS™ Version 23. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet. Eine Box ist ein Rechteck und stellt den Bereich dar, in dem 50% der Daten liegen. Die Box wird durch das 25. und das 75. Quartil gebildet, wobei die Länge der Box dem Interquartilabstand (IQA) entspricht. Der IQA gibt an, wie stark die Werte gestreut sind. Er wird aus der Differenz des oberen und des unteren Quartils ermittelt. Der horizontale, durchgehende Strich innerhalb der Box stellt den Median dar. Werte die außerhalb der Box liegen werden durch "Whisker" (Antennen) dargestellt. Werte die mehr als das 1,5-Fache des IQA außerhalb der Box liegen, werden als Ausreißer bezeichnet, und mit einem Kreis gekennzeichnet. Sollte der Wert um mehr als das Dreifache des IQAs außerhalb der Box liegen, wird er mit einem Stern gekennzeichnet. Für die statistische Analyse wurden sowohl der %-DNA-Tail-Wert, als auch die Zell-Vitalität verwendet. Die für die Berechnung des %-DNA-Tail benutzten Werte wurden durch den Mittelwert von je 80 ausgewerteten Zellen bestimmt. Zur Bestimmung der zyto- und genotoxischen Wirkung wurden mehrere statistische

Testverfahren verwendet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde untersucht, ob die Grundgesamtheit der Werte einer Normalverteilung unterlag. Da dies durchweg nicht der Fall war ( $p > 0,05$ ), wurde eine Varianzanalyse durch den nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt. Dieser Test analysiert, ob ein signifikanter Unterschied zwischen zentralen Tendenzen mehrerer verschiedener Stichproben besteht, wobei die Werte mindestens einer ordinal skalierten Population entstammen müssen. Der Vorteil dieses Tests liegt darin, dass man mehr als zwei Gruppen miteinander vergleichen kann. Die Aussage, ob zwei Wertepaare einen statistisch signifikanten Unterschied aufweisen, wurde mit der Dunns (Bonferroni)-Methode überprüft. Die Dunns-Methode kommt zum Einsatz, wenn die Anzahl der Stichproben der getesteten Wertepaare ungleich groß ist und neutralisiert bei multiplen Vergleichen die Alphafehlerkumulierung. Das Signifikanzniveau der verschiedenen Untersuchungen lag bei  $p < 0,05$ .

## 2.12 Methodenspezifisches Material

### 2.12.01 Vitalitätsbestimmung mit WST-8

<b>Vitalitätsbestimmung WST-8</b>	<b>Firma</b>
<b>Materialien</b>	
Colorimetric Cell Viability Kit I	Promocell, Heidelberg

### 2.12.02 Miniorgankulturen

<b>Miniorgankulturen</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Bronchial Epithelial Growth Medium</b>	
500ml Bronchial Epithelial Basalmedium (BEBM)  Supplement Pack:  BPE-26, hEGF-5, Insulin-2.5,  HC-250, Epinephrin-250, T3-3.35,  Transferrin-5, RA-50	Suppl. Pack unter sterilen Verhältnissen zugeben, gut mischen und bei 4°C lagern

<b>Agar 1,5%</b>	
0,45g Agarpulver (Agar Noble)  30ml Aqua bidest.	Agarpulver und Aqua bidest. vermischen und in Mikrowelle erhitzen und sterilisieren

<b>DMEM-Medium</b>	
500ml Aqua bidest.  9,99g DMEM Pulver  1,96g HEPES Pulver	DMEM und HEPES in Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen, steril filtrieren und in 250ml Portionen abfüllen

<b>DMEM-Agaroseplatten</b>	
30ml Agar Noble 30ml DMEM 6ml FCS 75µl nicht essentielle Aminosäuren 240µl Amphotericin B 120µl Penicillin-Streptomycin-Lösung	DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin in sterilem Gefäß vermischen. Agar Noble erhitzen, mit supplementiertem Medium versetzen und 24-Well-Platte mit mit Multipipette mit 250µl beschichten

<b>Enzymlösung zur Zellisolierung</b>	
50mg Protease 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P	In 10ml BEGM lösen, steril filtrieren

<b>Enzyme, Zellkulturmedien, Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
DMEM-Medium	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Fötales Kälber Serum	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
HEPES	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
(N-2-Hydroxaethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure)	
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)	Promocell, Heidelberg
Supplement Pack für BEBM	Promocell, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	Apotheke, LMU
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA

## 2.12.03 Mikrogelelektrophorese

<b>Mikrogelelektrophorese</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Agarose</b>	
0,5% Low-Melting-Agarose 0,7% Normal-Melting- Agarose PBS	In PBS lösen, erhitzen und im Wasserbad bei 37°C aufbewahren

<b>Lysestammlösung</b>	
146,4 NaCl (2,5M) 1,2g Trishydroxymethylaminomethan (10mM) 37,2g Na <sub>2</sub> EDTA (100mM) 10g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest.	NaCl, Trishydroxymethylaminomethan in 500ml Aqua bidest. lösen, Na <sub>2</sub> EDTA in 160ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen, N-Lauroylsarcosinnatriumsalz in 160ml Aqua bidest. lösen, alles vermischen und mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen, pH-Wert auf 10 einstellen

<b>Lysepuffer</b>	
1ml Triton X-100 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in 100ml Messzylinder geben, mit Lysestammlösung auf 100ml auffüllen

<b>Elektrophoresepuffer</b>	
24g NaOH-Plätzchen (300mM) 0,744g Na <sub>2</sub> EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na <sub>2</sub> EDTA in 2l Aqua bidest. lösen, bei 4°C lagern

<b>Neutralisationspuffer (400 ml)</b>	
48,5g Trishydroxymethylaminomethan  Aqua bidest.	Trishydroxymethylaminomethan in  1l Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen, Aufbewahrung bei Raumtemperatur

<b>Ethidiumbromid-Färbelösung</b>	
0,2mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung  Aqua bidest.	1:10 Verdünnung mit Aqua bidest., sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren

<b>Enzyme, Zellkulturmedien, Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Bronchial Epithelial Basal Medium	Promocell, Heidelberg
Supplement Pack für BEBM	Promocell, Heidelberg
Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche, Mannheim
Kollagenase P aus Clostridium histolyticum	Roche, Mannheim
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Low Melting-Agarose, Sea-Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Natriumhydroxid Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin Natrium Salz	Sigma, Steinheim
Normal Melting-Agarose, Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,4%	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt

## 2.12.04 Geräte und Zubehör, Verbrauchsmaterial

Geräte und Zubehör	Firma
Analysenwaage Voyager (0,1mg-62mg)	Ohaus, Gießen
<u>Auswertung/Datenspeicherung:</u>	
Programm Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool
Datenspeicherung	Microsoft Excel
Elektrophoresenetzgerät E865	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank (-80)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Horizontale Elektrophoresekammer (237x180mm)	Renner, Dannstadt
Kühlschrank (+ 4°C) und Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Inkubator	
<u>Mikroskope:</u>	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Inversmikroskop DMIRB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem N2.1, BP 516-560	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem I3, BP 450-490	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Objektive 100x/1,25 Öl; 40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikroplattenleser VersaMax	Molecular Devices, San Jose, USA
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	IKA-WORKS, Wilmington, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Waage 1419 (1mg-600g)	Sartorius, Gießen

<b>Geräte und Zubehör</b>	<b>Firma</b>
Zellzählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.ORS und 3.OR	Heraeus, Hanau

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Firma</b>
96-Well Platte	Eppendorf, Hamburg
24-Well-Platte	Falcon, Heidelberg
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Objektträger 24×70 mm, je 5mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten	GLW, Würzburg
Deckgläser für Objektträger (76×26 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5ml, 10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Farbfilme ISO 100	Agfa, Leverkusen
Pipette aus Polystyrol (2, 5, 10, 25ml), steril	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (200, 1000µl), steril	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (13ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Stericup (150ml), steril	Millipore, Eschborn
Skalpell	Pfm., Köln
Petrischalen	VWR, Deutschland
Pinzetten	Angiokard, Deutschland
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt

(Schuster, 2009)



### 3. Ergebnis

**Analyse der Zyto- und Genotoxizität der Apfel-, Kirsch- und Tabakliquide, sowie der Basisliquide an Miniorgankulturen gesunder humaner Schleimhaut**

#### 3.1 Vitalitätsmessungen zur Analyse der Zytotoxizität

##### 3.1.1 Vitalitätsmessung für das Basisliquid Frucht sowie für das Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25%, n=20; WST-8 Test

Die Vitalitätsmessungen für das Basisliquid Frucht sowie für das Apfel- und das Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25% mit dem WST-8 Test führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 17) ausgewiesenen Ergebnissen.

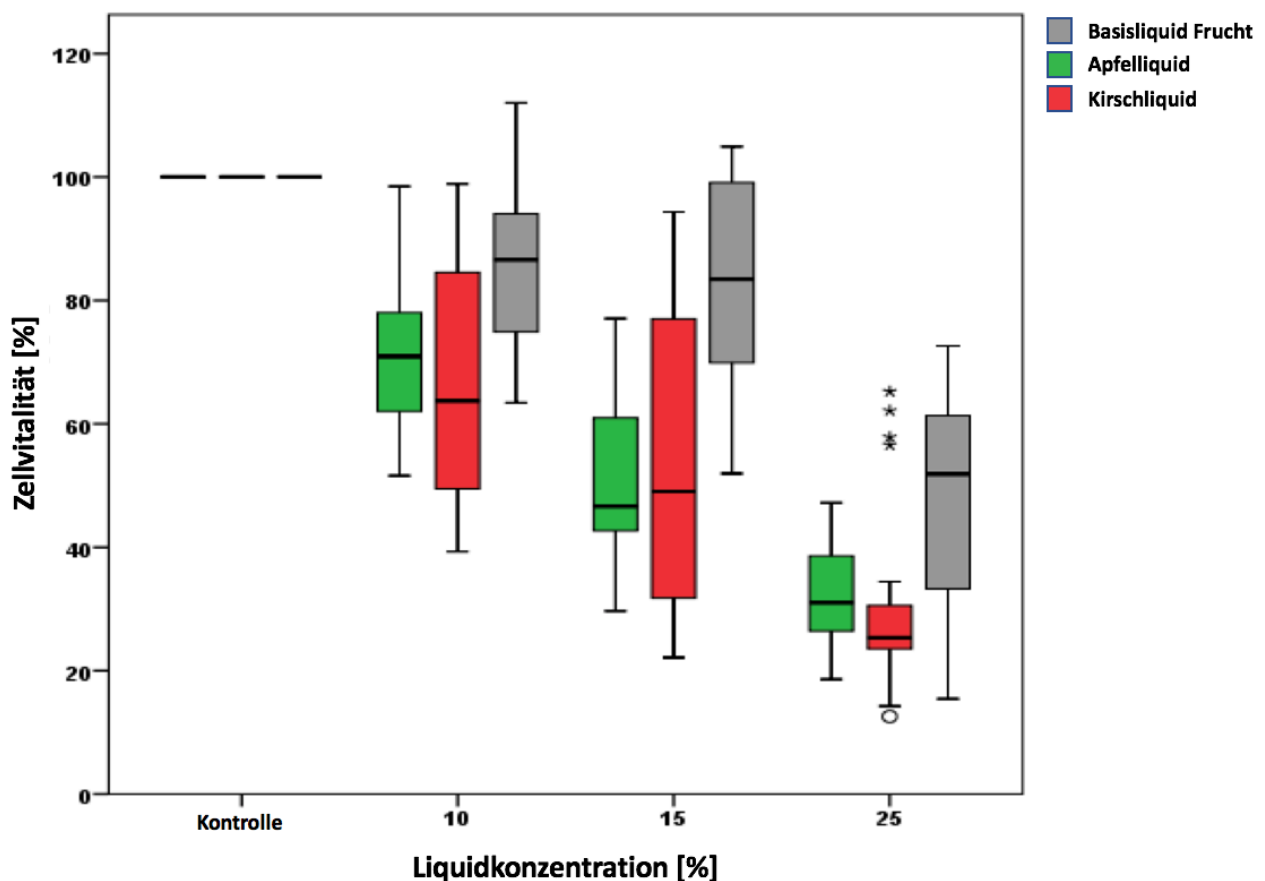


Abb. 18 Vitalitätsmessung für das Basisliquid Frucht, sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25%, n=20; WST-8 Test

Kontrolle: BEGM 100%

Um einen Ausgangswert zu erhalten, wurde die Vitalität der Kontrolle mit 100% gleichgesetzt. Die Analyse der Vitalität bei Inkubation mit Apfelliqualid (A), zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (A10%) eine Vitalität von 71,16%, bei 15-prozentiger Konzentration (A15%) eine Vitalität von 48,14% und bei 25-prozentiger Konzentration (A25%) eine Vitalität von 37,02%. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich in allen Tests eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich bei dem Vergleich des 10-prozentigen mit dem 25-prozentigen Apfelliqualid eine statistische Signifikanz. (Tab. 1)

<b>Apfelliqualid (A)</b>	<b>A10% - Kontrolle</b>	<b>A15% - Kontrolle</b>	<b>A25% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	<0,05	<0,05
	<b>A10% - A15%</b>	<b>A10% - A25%</b>	<b>A15% - A25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 1 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Apfelliqualid in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% mit der Kontrolle und der Konzentrationen des Apfelliqualid untereinander.

Die Analyse der Vitalität bei Inkubation mit Kirschliqualid (K), zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (K10%) eine Vitalität von 65,36%, bei 15-prozentiger Konzentration (K15%) eine Vitalität von 53,01% und bei 25-prozentiger Konzentration (K25%) eine Vitalität von 25,35%. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich in allen Tests eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich bei dem Vergleich des 10-prozentigen mit dem 25-prozentigen Kirschliqualid eine statistische Signifikanz. (Tab. 2)

<b>Kirschliquid</b>	<b>K10% - Kontrolle</b>	<b>K15% - Kontrolle</b>	<b>K25% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	<0,05	<0,05
	<b>K10% - K15%</b>	<b>K10% - K25%</b>	<b>K15 - K25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 2 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Kirschliquid in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% mit der Kontrolle und der Konzentrationen des Kirschliquid untereinander.

Die Analyse der Vitalität bei Inkubation mit Basisliquid Frucht (BF), zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BF10%) eine Vitalität von 84,13%, bei 15-prozentiger Konzentration (BF15%) eine Vitalität von 88,61% und bei 25-prozentiger Konzentration (BF25%) eine Vitalität von 51,90%. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich lediglich bei dem Vergleich des 25-prozentigen Basisliquid Frucht mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich bei dem Vergleich des 10-prozentigen mit der 25-prozentigen und des 15-prozentigen mit der 25-prozentigen Konzentration des Basisliquid Frucht eine statistische Signifikanz. (Tab. 3)

<b>Basisliquid Frucht (BF)</b>	<b>BF10% - Kontrolle</b>	<b>BF15% - Kontrolle</b>	<b>BF25% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>BF10% - BF15%</b>	<b>BF10% - BF25%</b>	<b>BF15 - BF25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	<0,05

Tab. 3 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Frucht in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% mit der Kontrolle und den Konzentrationen des Basisliquid Frucht untereinander.

Bei dem Vergleich des Apfelliqualid und des Basisliquid Frucht in den Konzentrationen 10%, 15% und 25%, zeigte sich in allen Tests eine Signifikanz. (Tab. 4)

<b>Apfelliqualid - Basisliquid Frucht</b>	<b>A10% - BF10%</b>	<b>A15%-BF15%</b>	<b>A25% - BF25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	<0,05	<0,05

Tab. 4 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Apfelliqualid mit dem Basisliquid Frucht in den Konzentrationen 10%, 15% und 25%.

Bei dem Vergleich des Kirschliquid in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% mit dem Basisliquid Frucht in den Konzentrationen 10%, 15% und 25%, zeigte sich eine Signifikanz bei dem Vergleich des 15-prozentigen Kirschliquid mit dem 15-prozentigen Basisliquid Frucht. (Tab. 5)

<b>Kirschliquid - Basisliquid Frucht</b>	<b>K10% - BF10%</b>	<b>K15%-BF15%</b>	<b>K25% - BF25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 5 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Kirschliquid mit dem Basisliquid Frucht in den Konzentrationen 10%, 15% und 25%.

### 3.1.2 Vitalitätsmessung für das Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25% mit WST-8 Test.

Die Vitalitätsmessungen für das Basisliquid Tabak sowie für das Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25% mit dem WST-8 Test führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 18) ausgewiesenen Ergebnissen.

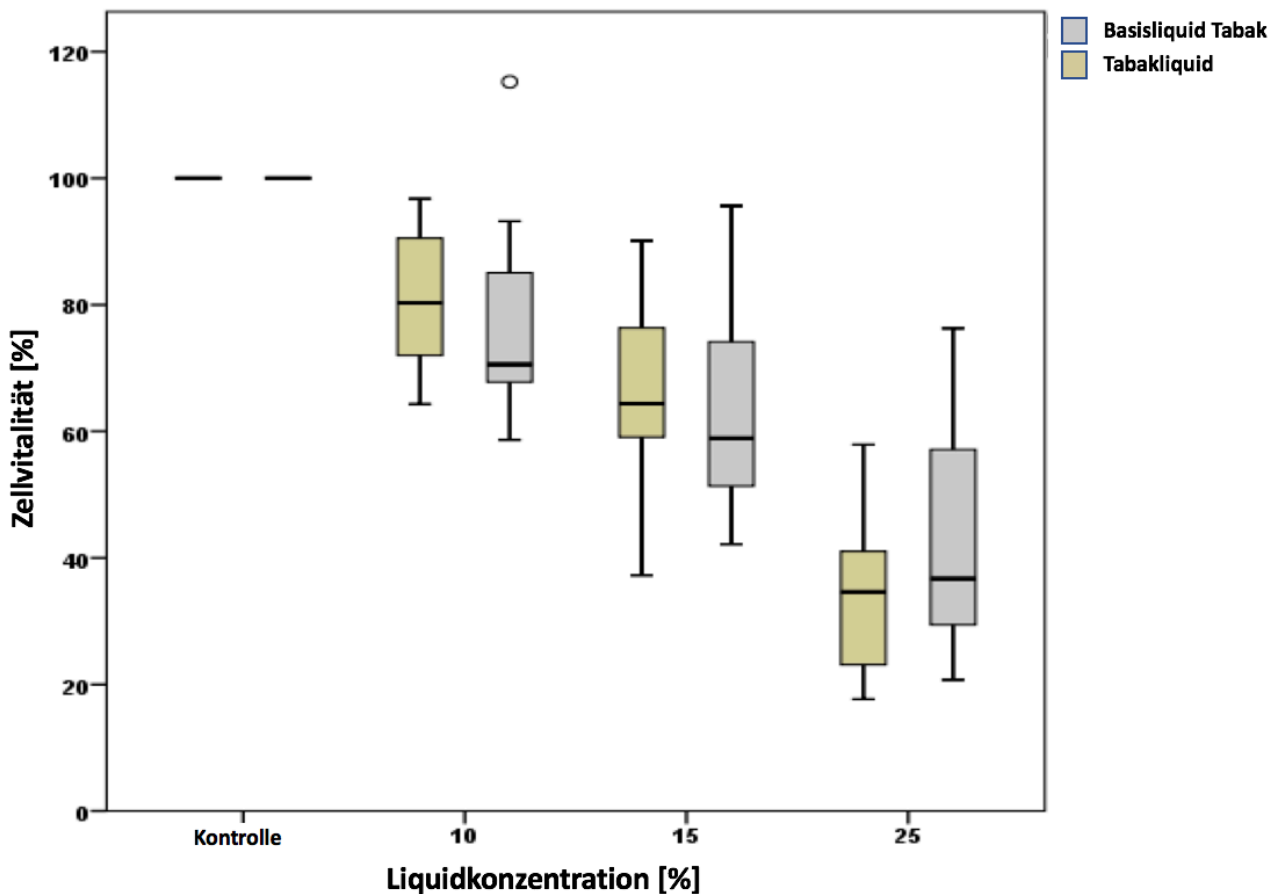


Abb.19 Vitalitätsmessung des Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25%, n=20; WST-8 Test

Analog zu den Versuchen mit Fruchtliquiden und deren Basis wurde, um einen Ausgangswert zu erhalten, die Vitalität der Kontrolle mit 100% gleichgesetzt.

Die Analyse der Vitalität bei Inkubation mit Tabakliquid (T) zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (T10%) eine Vitalität von 82,72%, bei 15-prozentiger Konzentration (T15%) eine Vitalität von 69,77% und bei 25-prozentiger Konzentration (T25%) eine Vitalität von 34,62%.

Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich der 15-prozentigen Konzentration mit der Kontrolle und bei dem Vergleich der 25-prozentigen Konzentration mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich bei dem Vergleich der 10-prozentigen mit der 15-prozentigen Konzentration und bei dem Vergleich der 15-prozentigen mit der 25-prozentigen Konzentration eine statistische Signifikanz. (Tab. 6)

<b>Tabakliquid</b>	<b>T10% - Kontrolle</b>	<b>T15% - Kontrolle</b>	<b>T25% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	<0,05
	<b>T10% - T15%</b>	<b>T10% - T25%</b>	<b>T15 - T25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	<0,05

Tab. 6 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Tabakliquid mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% und der einzelnen Konzentrationen des Tabakliquid untereinander.

Die Analyse der Vitalität bei Inkubation mit Basisliquid Tabak (BT) zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BT10%) eine Vitalität von 72,44%, bei 15-prozentiger Konzentration (BT15%) eine Vitalität von 60,16% und bei 25-prozentiger Konzentration eine Vitalität von 38,61%. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich in allen Tests eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich bei dem Vergleich des 10-prozentigen mit der 25-prozentigen Konzentration des Basisliquid Tabak eine statistische Signifikanz. (Tab. 7)

<b>Basisliquid Tabak (BT)</b>	<b>BT10% - Kontrolle</b>	<b>BT15% - Kontrolle</b>	<b>BT25% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	<0,05	<0,05
	<b>BT10% - BT15%</b>	<b>BT10% - BT25%</b>	<b>BT15% - BT25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 7 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Tabak mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% und der einzelnen Konzentrationen des Basisliquid Tabak untereinander.

Bei dem Vergleich des Tabakliquid in den Konzentrationen 10%, 15% und 25% mit dem Basisliquid Tabak in den Konzentrationen 10%, 15% und 25%, zeigte sich in allen Tests keine statistische Signifikanz. (Tab. 8)

<b>Tabakliquid - Basisliquid Tabak (BT)</b>	<b>T10% - BT10%</b>	<b>T15% - BT15%</b>	<b>T25% - BT25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 8 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Tabakliquid mit dem Basisliquid Tabak in den Konzentrationen 10 %, 15 % und 25 %.

### 3.1.3 Vergleich der Zellvitalität für die Fruchtliquide, das Tabakliquid und die Basisliquide untereinander in der Konzentration 15% mit WST-8 Test.

Der Vergleich der Zellvitalität für die Fruchtliquide, das Tabakliquid und die Basisliquide bei einer Konzentrationen von 15% mit dem WST-8 Test führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 19) ausgewiesenen Ergebnissen.

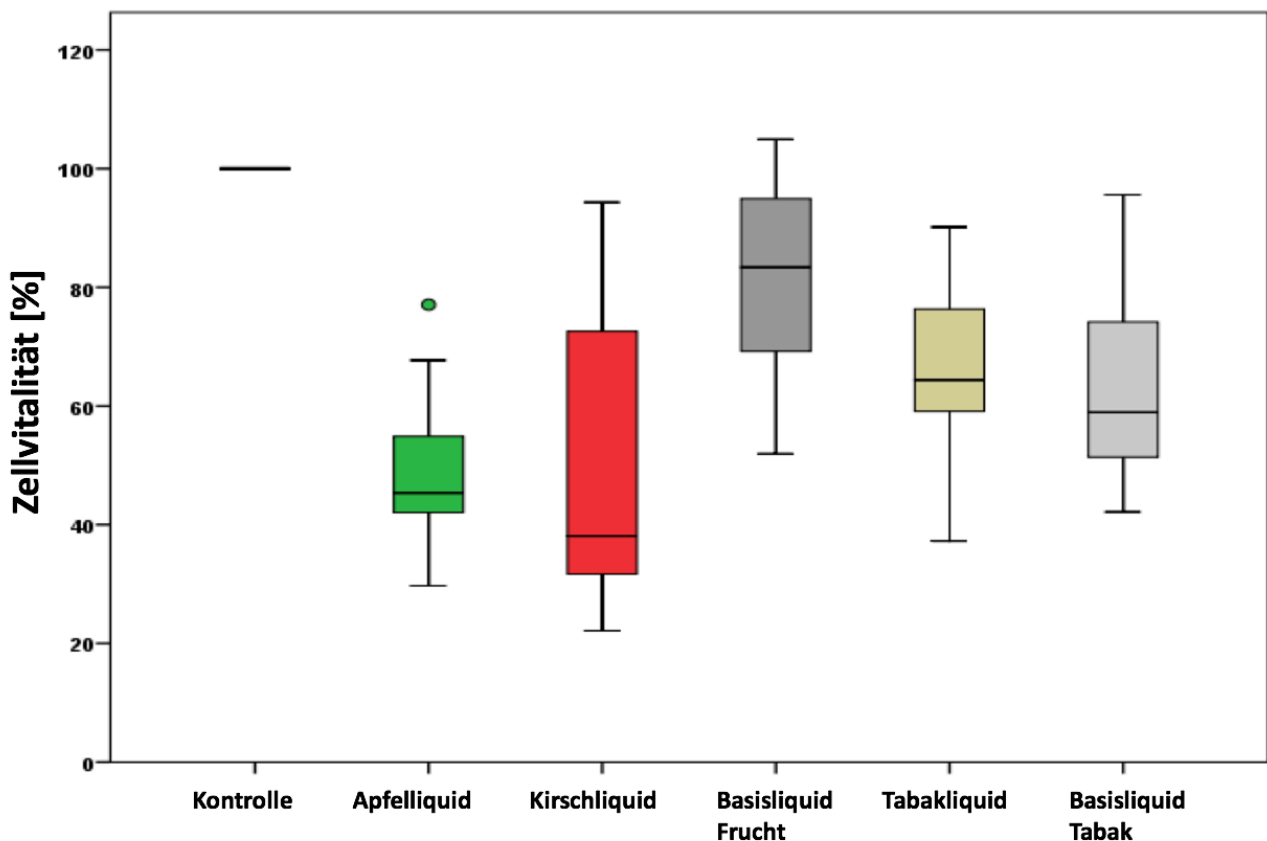


Abb. 20 Vergleich der Zellvitalität für die Basisliquide, die Fruchtliquide und das Tabakliquid in der Konzentration 15%, n=20; WST-8 Test

Bei dem Vergleich der Liquide untereinander zeigt sich bei beiden getesteten Fruchtliquiden gegenüber dem Basisliquid Frucht eine statistische Signifikanz. Bei dem Vergleich der Basisliquide untereinander zeigte sich für das Basisliquid Frucht eine statistisch signifikante Minderung der Zellvitalität. Bei dem Vergleich der Fruchtliquide mit dem Tabakliquid zeigte nur das Kirschliquid eine statistische Signifikanz. Zwar zeigte sich bei dem Apfelloid eine höhere Minderung der Zellvitalität als bei dem Tabakliquid, jedoch zeigte sich dies nicht statistisch signifikant. (Tab. 9)



<b>Liquid 15%</b>	<b>A15% - BF15%</b>	<b>K15% - BF15%</b>	<b>BF15% - BT15%</b>	<b>A15% - T15%</b>	<b>K15% - T15%</b>
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 9 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich aller Liquide untereinander bei einer Konzentration von 15%.

### 3.1.4 Vergleich der Zellvitalität für die Fruchtliquide, das Tabakliquid und die Basisliquide in den Konzentrationen 10% und 25% mit WST-8 Test

Bei dem Vergleich der Zellvitalität für die Fruchtliquide, das Tabakliquid und die Basisliquide in den Konzentrationen 10% und 25% untereinander zeigte sich lediglich eine statistische Signifikanz des Kirschliquids gegenüber dem Basisliquid Frucht bei den jeweiligen Konzentrationen. Alle anderen Vergleiche zeigten keine statistische Signifikanz. (Tab. 10)

<b>Liquid 10%</b>	<b>A10% - BF10%</b>	<b>K10% - BF10%</b>	<b>BF10% - BT10%</b>	<b>A10% - T10%</b>	<b>K10% - T10%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
<b>Liquid 25%</b>	<b>A25% - BF25%</b>	<b>K25% - BF25%</b>	<b>BF25% - BT25%</b>	<b>A25% - T25%</b>	<b>K25% - T25%</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05

Tab. 10 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich aller Liquide untereinander bei einer Konzentration von 10% und 25%.

## 3.2 Auswertung der Gelelektrophorese zur Analyse der Genotoxizität

### 3.2.1 Messung der Genotoxizität des Basisliquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einer Inkubation für einmalig 24 Stunden (24).

Die Messung der Genotoxizität bei einmaliger Gabe (24) des Basisliquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 20) ausgewiesenen Ergebnissen.

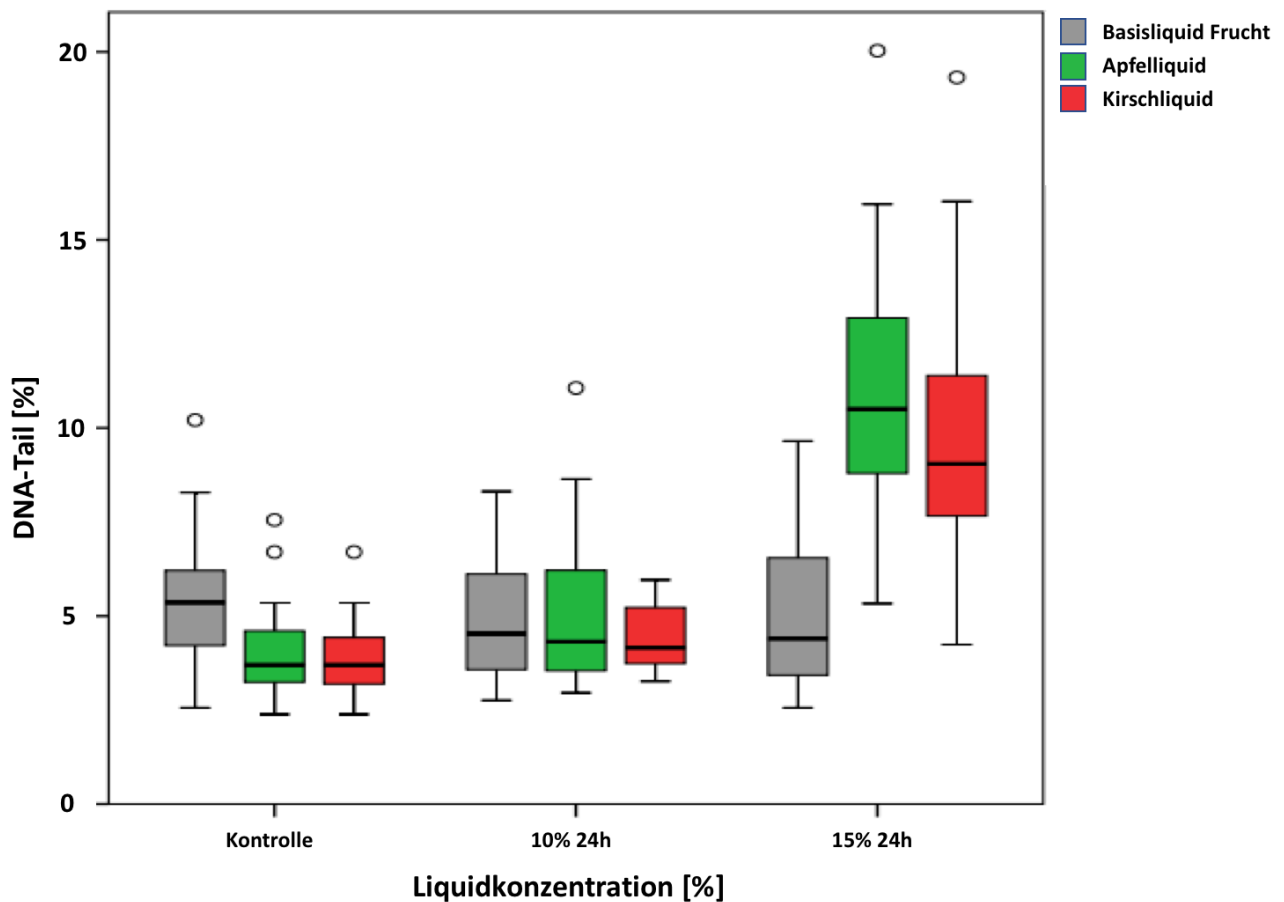


Abb. 21 Genotoxizitätsmessung des Basisliquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einmaliger Inkubation für 24 Stunden, n=20

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über einmalig 24 Stunden mit Apfelliqualid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (A(24)10%) einen Wert von 4,322 %-DNA-Tail und bei 15%-prozentiger Konzentration (A(24)15%) einen Wert von 10,499%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich des 15-prozentigen Apfelliqualid mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der Konzentrationen untereinander zeigte sich ebenfalls eine statistische Signifikanz. (Tab. 11)

<b>Apfelliqualid 24Std</b>	<b>A(24)10% - Kontrolle</b>	<b>A(24)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>A(24) 10% - A(24) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	

Tab. 11 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Apfelliqualid nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Apfelliqualid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über einmalig 24 Stunden mit Kirschliqualid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (K(24)10%) einen Wert von 4,160%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (K(24)15%) einen Wert von 9,047%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich des 15-prozentigen Kirschliqualid mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der Konzentrationen untereinander zeigte sich ebenfalls eine statistische Signifikanz. (Tab. 12)

<b>Kirschliquid 24Std</b>	<b>K(24)10% - Kontrolle</b>	<b>K(24)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>K(24) 10% - K(24) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	

Tab. 12 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Kirschliquid nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Kirschliquid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über einmalig 24 Stunden mit dem Basisliquid Frucht zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BF(24)10%) einen Wert von 4,530%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (BF(24)15%) einen Wert von 4,400%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle sowie bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab.13)

<b>Basisliquid Frucht 24Std</b>	<b>BF(24)10% - Kontrolle</b>	<b>BF(24)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)
	<b>BF(24) 10% - BF(24) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 13 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Frucht nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Basisliquid Frucht untereinander.

### 3.2.2 Messung der Genotoxizität des Basisliquid Frucht, sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einer Inkubation von 5-mal je 2,5 Stunden (rep).

Die Messung der Genotoxizität bei wiederholter Gabe (rep) des Basisliquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 21) ausgewiesenen Ergebnissen.

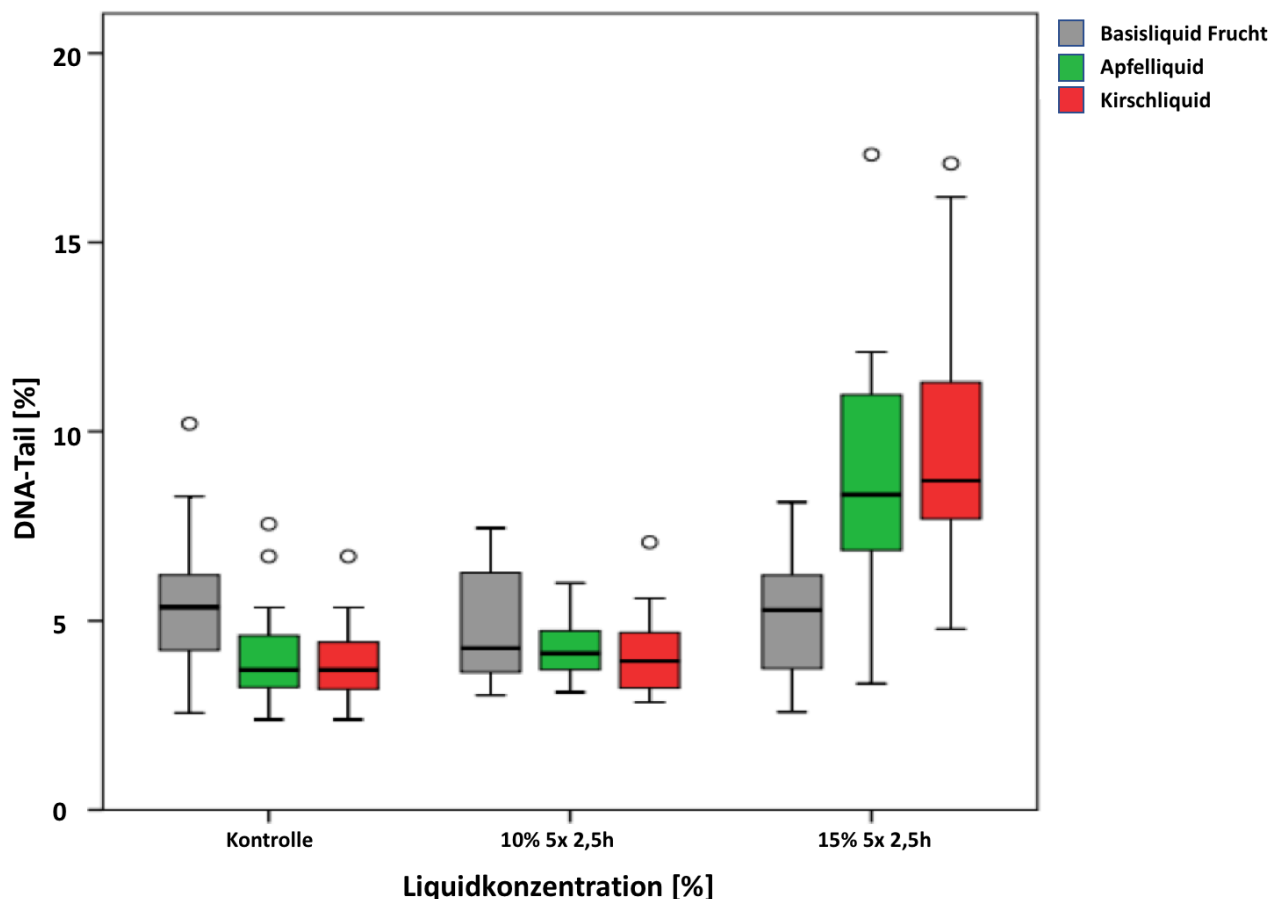


Abb. 22 Genotoxizitätsmessung des Basisliquid Frucht, sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, bei einer Inkubation von 5-mal je 2,5 Stunden, n=20

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden mit Apfelliqualid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (A(rep)10%) einen Wert von 4,142%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (A(rep)15%) einen Wert von 8,419%-DNA-Tail.

Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich des 15-prozentigen Apfelliqualid mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich ebenfalls eine statistische Signifikanz. (Tab. 14)

<b>Apfelliqualid (rep)</b>	<b>A(rep)10% - Kontrolle</b>	<b>A(rep)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>A(rep) 10% - A(rep) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	< 0,05	

Tab. 14 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Apfelliqualid nach Inkubation für 5-mal je 2,5 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Apfelliqualid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden mit Kirschliqualid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (K(rep)10%) einen Wert von 4,167%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (K(rep)15%) einen Wert von 8,468%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich des 15-prozentigen Kirschliqualid mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich ebenfalls eine statistische Signifikanz. (Tab.15)

<b>Kirschliqualid (rep)</b>	<b>K(rep)10% - Kontrolle</b>	<b>K(rep)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>K(rep) 10% - K(rep) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	<0,05	

Tab. 15 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Kirschliqualid nach Inkubation für 5-mal je 2,5 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Kirschliqualid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden mit Basisliquid Frucht zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BF(rep)10%) einen Wert von 4,275%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (BF(rep)15%) einen Wert von 5,285%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle, so wie bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab.16)

<b>Basisliquid Frucht (rep)</b>	<b>BF(rep)10% - Kontrolle</b>	<b>BF(rep)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)
	<b>BF(rep) 10% - BF(rep) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 16 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Frucht nach Inkubation für 5-mal je 2,5 Stunden mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Basisliquid Frucht untereinander.

### 3.2.3 Messung der Genotoxizität des Basisliquid Tabak, so wie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einer Inkubation für einmalig 24 Stunden (24).

Die Messung der Genotoxizität bei einmaliger Gabe (24) des Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 22) ausgewiesenen Ergebnissen.

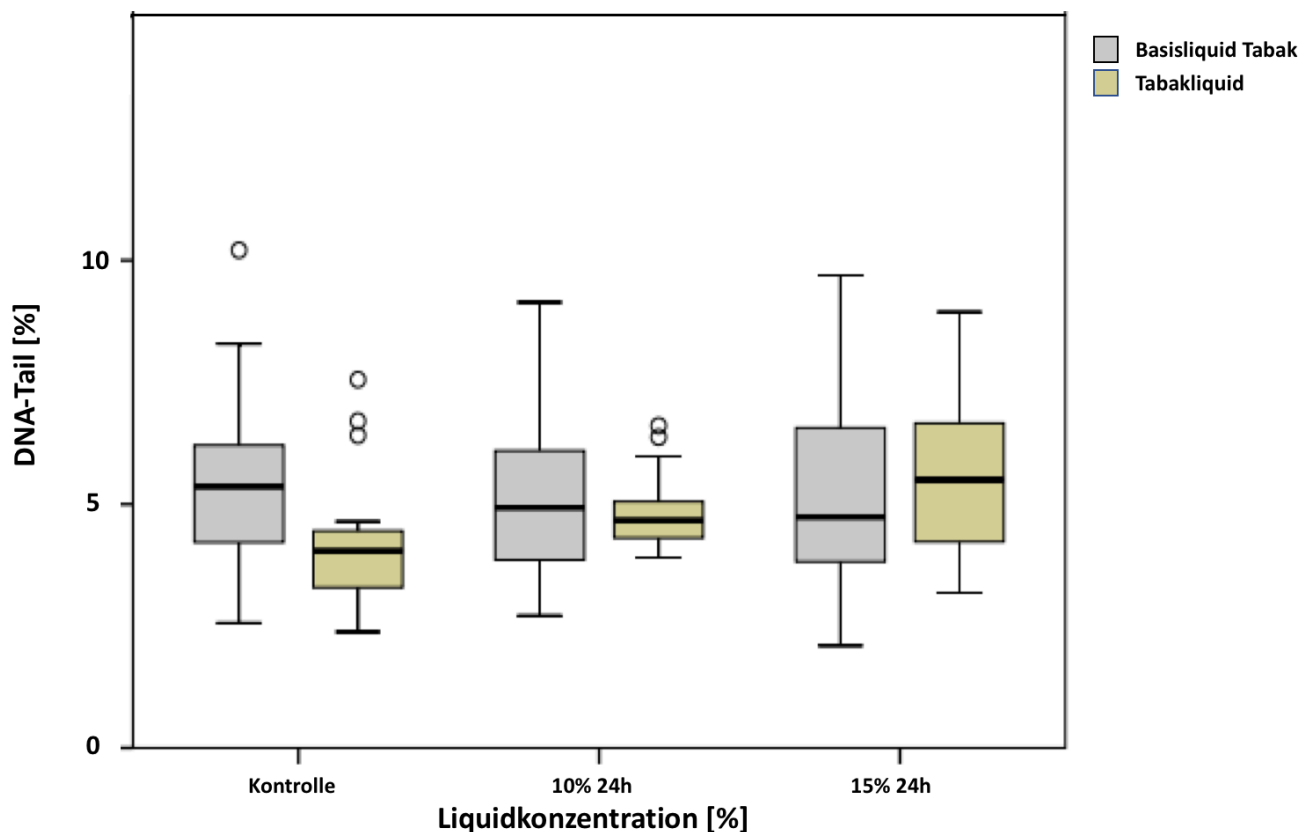


Abb. 23 Genotoxizitätsmessung des Basisliquid Tabak und des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, nach einer Inkubation für einmalig 24 Stunden, n=20

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über einmalig 24 Stunden mit Tabakliquid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (T(24)10%) einen Wert von 4,670%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (T(24)15%) einen Wert von 5,495%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle zeigte sich bei dem Vergleich des 15-prozentigen Tabakliquid mit der Kontrolle eine Signifikanz. Bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab. 17)



<b>Tabakliquid 24Std</b>	<b>T(24)10% - Kontrolle</b>	<b>T(24)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	<0,05
	<b>T(24) 10% - T(24) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 17 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Tabakliquid, nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden, mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Tabakliquid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über einmalig 24 Stunden mit Basisliquid Tabak zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BT(24)10%) einen Wert von 4,930%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (BT(24)15%) einen Wert von 4,735%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle sowie bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab.18)

<b>Basisliquid Tabak 24Std</b>	<b>BT(24)10% - Kontrolle</b>	<b>BT(24)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)
	<b>BT(24) 10% - BT(24) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 18 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Tabak, nach einmaliger Inkubation für 24 Stunden, mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Basisliquid Tabak untereinander.

### 3.2.4 Messung der Genotoxizität der Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einer Inkubation von 5-mal je 2,5 Stunden (rep).

Die Messung der Genotoxizität bei wiederholter Gabe (rep) des Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 23) ausgewiesenen Ergebnissen.

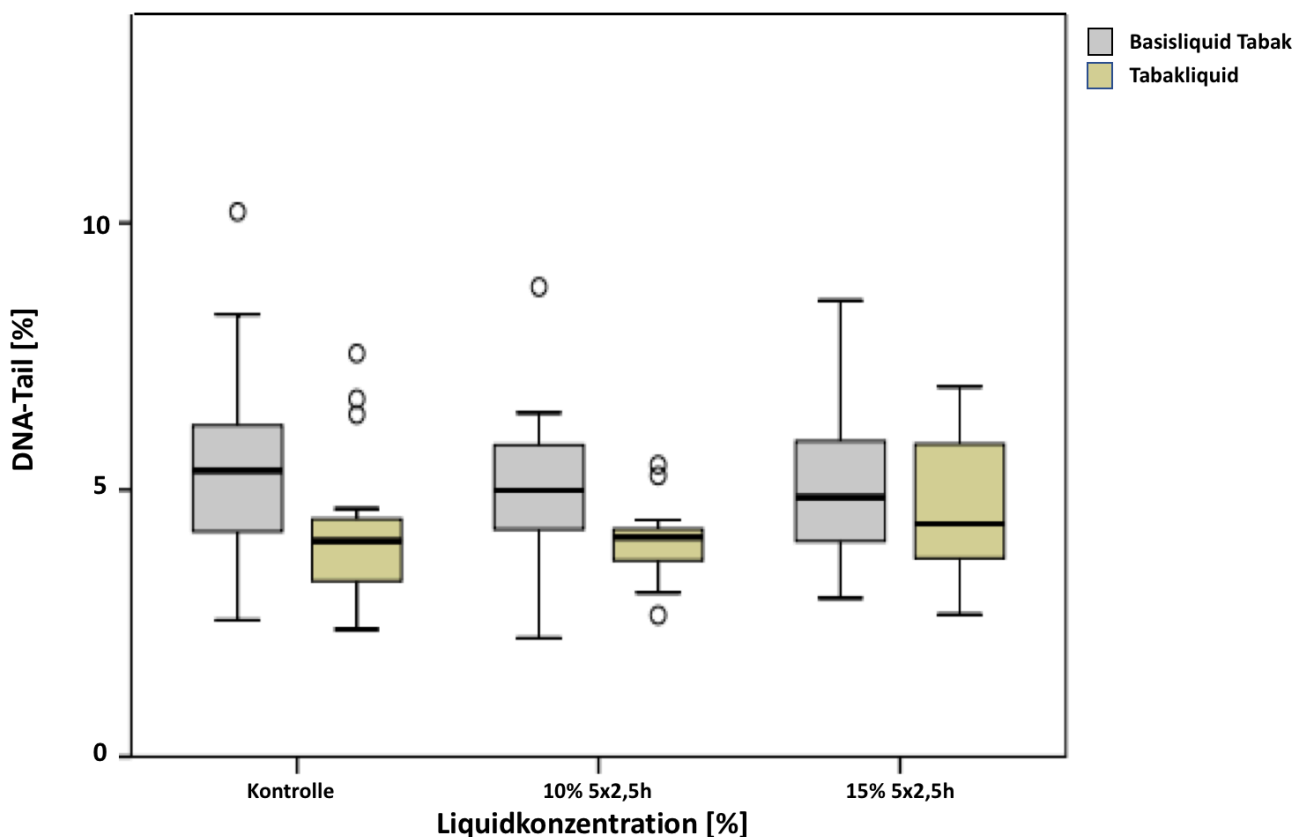


Abb. 24 Genotoxizitätsmessung des Basisliquid Tabak und des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, bei 5 mal 2,5-stündiger Inkubation, n=20

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden mit Tabakliquid zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (T(rep)10%) einen Wert von 4,120%-DNA-Tail und bei 15-prozentiger Konzentration (T(rep)15%) einen Wert von 4,360%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle sowie bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab.19)

<b>Tabakliquid (rep)</b>	<b>T(rep)10% - Kontrolle</b>	<b>T(rep)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)
	<b>T(rep) 10% - T(rep) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 19 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Tabakliquid, nach fünfmaliger 2,5-stündige Inkubation, mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Tabakliquid untereinander.

Die Analyse der Genotoxizität bei Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden mit Basisliquid Tabak zeigte im Median bei 10-prozentiger Konzentration (BT(rep)10%) einen Wert von 4,990%-DNA-Tail und bei 15 prozentiger Konzentration (BT(rep)15%) einen Wert von 5,030%-DNA-Tail. Bei dem Vergleich der Konzentrationen mit der Kontrolle sowie bei dem Vergleich der einzelnen Konzentrationen untereinander zeigte sich keine statistische Signifikanz. (Tab.20)

<b>Basisliquid Tabak (rep)</b>	<b>BT(rep)10% - Kontrolle</b>	<b>BT(rep)15% - Kontrolle</b>
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	>0,05 (keine Signifikanz)
	<b>BT(rep) 10% - BT(rep) 15%</b>	
Signifikanz (p-Wert)	>0,05 (keine Signifikanz)	

Tab. 20 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich des Basisliquid Tabak, nach fünfmaliger 2,5-stündige Inkubation, mit der Kontrolle in den Konzentrationen 10% und 15% und der Konzentrationen des Basisliquid Tabak untereinander.

### 3.2.5 Vergleich der Inkubationsarten durch Analyse der Genotoxizität der Basisliquide, der Fruchtliquide und des Tabakliquid, sowie Vergleich der Genotoxizität aller Liquide untereinander bei 15% Konzentration.

Der Vergleich der Inkubationsarten durch Messung der Genotoxizität der beiden Basisliquide sowie des Tabakliquid und der beiden Fruchtliquide, bei einer Konzentrationen von 15% führte in der statistischen Auswertung zu den in dem nachstehenden Diagramm (Abb. 24) ausgewiesenen Ergebnissen.

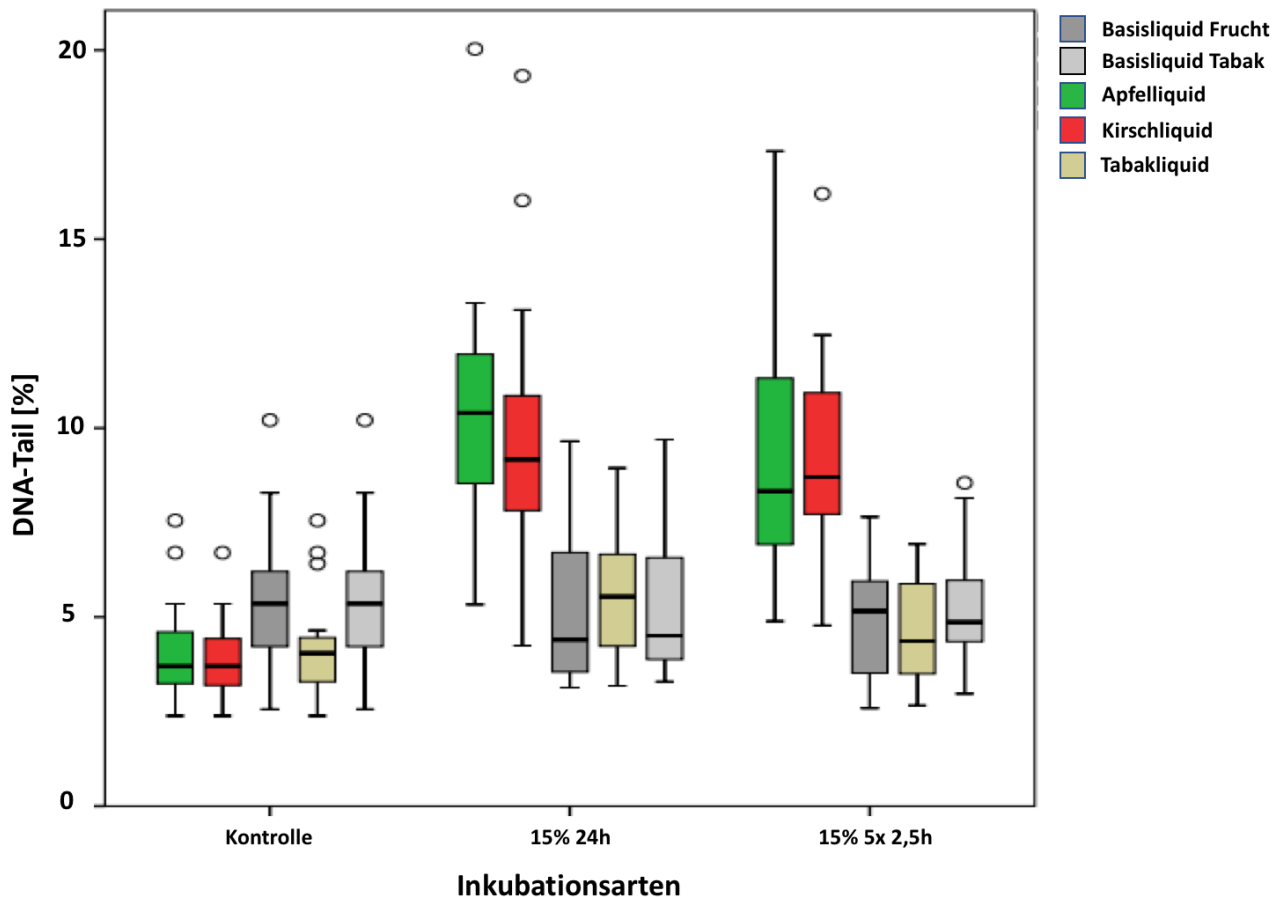


Abb. 25 Vergleich der Inkubationsarten durch Analyse der Genotoxizität des Basisliquid Tabak, des Basisliquid Frucht sowie der Apfel-, Kirsch- und Tabakliquide bei jeweils 15% Konzentration, n=20

Bei dem Vergleich der Inkubationsarten mit 15 prozentiger Konzentration aller getesteter Liquide zeigte sich im Hinblick auf die Genotoxizität in keinem der Tests eine statistische Signifikanz.

(Tab. 21)

Liquid	Signifikanz (p-Wert)
<b>BT(24)15% - BT(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>BF(24)15% - BF(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>A(24)15% - A(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>K(24)15% - K(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>T(24)15% - T(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 21 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich der Inkubationsarten bei 15 prozentiger Konzentration bei allen getesteten Liquiden.

### 3.2.6 Vergleich der Genotoxizität aller Liquide bei 15%iger Konzentration bei wiederholter Gabe.

Bei dem Vergleich der Genotoxizität aller getesteter Liquide untereinander mit 15 prozentiger Konzentration und Inkubation über 5 mal 2,5 Stunden zeigt sich eine statistische Signifikanz der Fruchtliquide gegenüber allen anderen Liquiden. (Tab. 22)

Liquid	Signifikanz (p-Wert)
<b>K(rep)15% - T(rep)15%</b>	<0,05
<b>K(rep)15% - BF(rep)15%</b>	<0,05
<b>K(rep)15% - BT(rep)15%</b>	<0,05
<b>A(rep)15% - T(rep)15%</b>	<0,05
<b>A(rep)15% - BF(rep)15%</b>	<0,05
<b>A(rep)15% - BT(rep)15%</b>	<0,05
<b>T(rep)15% - BF(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>T(rep)15% - BT(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>A(rep)15% - K(rep)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 22 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich der Liquide untereinander bei 15 prozentiger Konzentration und wiederholter Gabe.

### 3.2.7 Vergleich der Genotoxizität aller Liquide bei 15%iger Konzentration bei einmaliger Gabe.

Bei dem Vergleich der Genotoxizität aller getesteter Liquide untereinander mit 15 prozentiger Konzentration und Inkubation über einmalig 24 Stunden zeigt sich eine statistische Signifikanz der Fruchtliquide gegenüber allen anderen Liquiden. (Tab. 23)

Liquid	Signifikanz (p-Wert)
<b>K(24)15% - T(24)15%</b>	<0,05
<b>K(24)15% - BF(24)15%</b>	<0,05
<b>K(24)15% - BT(24)15%</b>	<0,05
<b>A(24)15% - T(24)15%</b>	<0,05
<b>A(24)15% - BF(24)15%</b>	<0,05
<b>A(24)15% - BT(24)15%</b>	<0,05
<b>T(24)15% - BF(24)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>T(24)15% - BT(24)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)
<b>A(24)15% - K(24)15%</b>	>0,05 (keine Signifikanz)

Tab. 23 p-Werte nach Dunns-Methode für den Vergleich der Liquide untereinander bei 15 prozentiger Konzentration und einmaliger Gabe.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Auswahl der Patienten**

Die Patienten, deren oropharyngeale Schleimhaut verwendet wurde um Miniorgankulturen herzustellen, wurden alle in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München behandelt. Die Indikation der Therapie bestand in den meisten Fällen aufgrund einer chronischen Entzündung der Rachenmandeln (chronische Tonsillitis), eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms oder klinischer Atemprobleme bei vergrößerter Uvula. Die operative Therapie erfolgte bei der chronischen Tonsillitis durch eine Tonsillektomie, welche vorzugsweise in einem nicht inflammatorischen Stadium durchzuführen war, die Therapie der vergrößerten Uvula sowie des Schlafapnoesyndroms erfolgte durch eine Uvulopalatopharyngoplastik. Beide operativen Verfahren erlaubten es, Schleimhaut zu gewinnen, aus welcher anschließend Miniorgankulturen hergestellt wurden.

### **4.2 Einmalige vs. mehrmalige Inkubation**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob es einen kumulativ-schädigenden Effekt der Fruchtliquide, der Nikotinliquide und der Basisliquide auf die oropharyngeale Schleimhaut gibt. Um dies zu testen, wurden parallel zwei Versuchsansätze durchgeführt. Bei der einmaligen Inkubation wurden die Miniorgankulturen einmalig für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Bei der mehrmaligen Inkubation, welche den Konsum von Nikotinliquiden über einen längeren Zeitraum und damit ein gewöhnliches Konsumverhalten imitieren soll, wurden die Miniorgankulturen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit für je 2,5 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach Vergleich der repetitiven (rep) mit der einmaligen Gabe (24) konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bei der Zyto- und Genotoxizität und somit kein kumulativ-schädigender Effekt festgestellt werden.

### **4.3 Geno- und zytotoxische Wirkung des Basisliquid Frucht und des Basisliquid Tabak**

Die Basisliquide (Lösungsbestandteile ohne Nikotin und Geschmacksstoffe) der untersuchten Liquide unterscheiden sich in ihrem Gehalt an den beiden Bestandteilen PG und G. Obwohl beide Bestandteile von der Food and Drug Administration (FDA) für die Aufnahme durch Verschlucken als

sicher eingestuft sind, wurden die Auswirkungen eines regelmäßigen Kontaktes zu den Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes bislang nicht untersucht (FDA, 2010). Um eventuelle genverändernde und zellschädigende Effekte dieser Ausgangsbestandteile zu testen, wurden ihre biologischen Auswirkungen im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht.

Das Basisliquid Frucht (BF) (80% Propylenglykol, 10% vegetarischem Glycerin und 10% Aqua dest.) zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Genotoxizität im Vergleich mit der Kontrolle. Lediglich bei der Zytotoxizität zeigte sich bei einer Konzentration von 25% ein Unterschied zur Kontrolle und zu den anderen Konzentrationen.

Das Basisliquid Tabak (BT) (60% vegetarischem Glycerin, 20% Propylenglykol und 20% Aqua dest.) zeigt bei dem Vergleich mit der Kontrolle keine genotoxischen Effekte, bei der Zytotoxizität zeigte sich ab einer Konzentration von 10% ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Das BT erwies sich bereits in der geringsten Verdünnungsstufe (10%) als zytotoxisch und unterscheidet sich damit von dem BF. Auch bei 15 prozentiger Konzentration zeigte das BT hochsignifikant höhere Zelltoxizität als das BF. Dies deutet darauf hin, dass den Konzentrationsstufen von Propylenglykol und Glycerin in den Basisliquiden eine zytotoxische Relevanz zukommt, die näher erforscht werden sollte.

Da die einzelnen Bestandteile des Basisliquid Frucht und des Basisliquid Tabak bekannt sind und diese auch schon in verschiedenen Studien untersucht wurden, werden diese nachstehend jeweils für sich betrachtet.

#### **4.3.1 Propylenglykol (1,2-Propandiol)**

O.H. Robertson et. al. untersuchten die Auswirkungen von Propylenglykol (PG) an Affen und Ratten. Dabei setzten sie diese hohen Mengen von vaporisiertem Propylenglykol über mehrere Monate aus. Es zeigten sich weder klinische Symptome, noch histologische Auffälligkeiten des Lungengewebes, der Nieren, der Leber, der Milz oder des Knochenmarks. O.H. Robertson schloss daraus, dass Luft, die bis zum Sättigungsniveau mit vaporisiertem Propylenglykol angereichert ist, vollkommen harmlos sei (Robertson, O. H., et al., 1947).

In einem ähnlichen Versuchsaufbau untersuchten Werley et al. den Einfluss von Propylenglykol-aerosolen an Ratten und Hunden. Der Versuch zeigte eine leichte Anreicherung des Propylenglykols in dem Gewebe, jedoch führte dies nicht zu einer Schädigung der Lunge, der Niere oder der Leber. Werley et al. schlussfolgerten, dass die Zufuhr von Propylenglykol-Aerosolen für Menschen als sicher anzunehmen sei (Werley, M. S., et al., 2011).



Allerdings fanden Hannuksela et al. heraus, dass oral aufgenommenes Propylenglykol zu allergischen Hautreaktionen und zu Exanthem führen kann; darüber hinaus zeigten sich bei einigen Patienten Übelkeit und Schwindel. Hannuksela et al. postulierten, dass Propylenglykol ein potenzielles Allergen sei und der Liste der Medikamente, welche ein Arzneimittelexanthem hervorrufen können, hinzugefügt werden sollte (Hannuksela M. et al., 1978).

Die Möglichkeit, dass Propylenglykol ein Auslöser von Kontaktdermatitis ist, wird in zahlreichen Studien beschrieben (El-Sayed et al., 1955; Fisher D., 1997; Farrar CW. Et al., 2003; Connolly M. et al., 2004).

In den Versuchen für die Vorliegende Arbeit zeigte sich einzig eine signifikante Zytotoxizität bei der höchsten getesteten Konzentration des Basisliquid Frucht (25%). Deshalb ist anzunehmen, dass PG eine untergeordnete Rolle in der Gesamtzytotoxizität der Liquide zukommt.

Bisher gibt es keinen Anhalt dafür, dass Propylenglykol eine karzinogene Wirkung auf Menschen zeigt (The Health Council of the Netherlands, 2007), jedoch wird Propylenglykol durch Hydrolyse aus Propylenoxid (1,2-Epoxypropan) hergestellt. Laut der International Agency for Research on Cancer (IARC), wurde Propylenoxid als “möglicherweise krebserregend“ eingestuft (IARC, 1994).

#### **4.3.2 Glycerin**

Armitage et al. untersuchten die toxischen Effekte von Glycerin(G) auf menschliche Granulozyten und stellten in Ihrem Versuchsaufbau sowohl die zelltoxischen als auch schädigenden osmotischen Eigenschaften von Glycerin dar (Armitage et al., 1984). Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich in einer Studie aus dem Jahr 2012, in welche toxischen Effekte von Glycerin auf Spermazellen untersucht wurden. Glycerin zeigte dabei dosisabhängige schädigende Effekte am Aktinzytoskelett, an der Zellmembran und an den Mitochondrien. Es wurde hier auch gezeigt, dass die schädigenden Effekte von Glycerin auf osmotischen und nonosmotischen Effekten beruhen (Marcias Garcia et al., 2012).

In einer weiteren Studie wurden die Effekte von Glycerin auf menschliche peritonela Mesotheliumzellen (HPMC) untersucht. Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der HPMC-Proliferation bei der Inkubation mit Glycerin. Ebenso verringerte Glycerin die Synthese von Proteinen und störte zelluläre Kalium-Transportmechanismen (Witowski et al., 1994).

Die oben genannten Studien beziehen sich alle auf Glycerin in flüssiger Form. In einem Versuchsaufbau aus dem Jahr 2015 wurden von Scheffler et al. die Eigenschaften von verdampftem Glycerin untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass Zellen, die verdampften Glycerin ausgesetzt waren eine signifikant reduzierte Lebensfähigkeit aufwiesen als Zellen, die sauberer Luft ausgesetzt waren (Scheffler et al., 2015).

Die Versuche für die vorliegende Arbeit brachten Ergebnisse, die mit den genannten Literaturaussagen vereinbar sind: Es zeigte sich, dass BT zytotoxische Effekte für die stark verdünnte 10%-Lösung aufwies und dass das BF hochsignifikant geringer zytotoxisch als BT in 15%iger Konzentration war. Da BT deutlich mehr Glycerin als BF enthält, geben diese Resultate einen Hinweis darauf, dass die Konzentration von Glycerin in den Liquiden für die Zytotoxizität relevant sein kann.

#### **4.4 Zytotoxizität der Liquide**

In den Versuchen für die vorliegende Arbeit zeigte sich, dass die getesteten Liquide ab einer Konzentration von 15% zytotoxische Effekte aufweisen, bei den Fruchtliquiden (FL) ergab sich diese Signifikanz schon bei 10%. Dabei fällt auf, dass die Fruchtliquide eine höhere Zytotoxizität als das Tabakliquid aufweisen, was sich bei der 15%igen Verdünnung statistisch signifikant zeigt. Zudem erwies sich das Tabakliquid nicht schädlicher als das Basisliquid Tabak (BT). Daraus lässt sich folgern,

- a) dass dem Tabakaroma in den untersuchten Konzentrationen keine eigenständige Zytotoxizität beigemessen werden kann und
- b) dass dem im Tabakliquid enthaltenen Nikotin ebenfalls keine eigenständige Zytotoxizität zukommt.

Die vorangegangenen Punkte deuten darauf hin, dass die zytotoxischen Effekte sich primär aus den Frucht-Aromastoffen oder den Bestandteilen der Basisliquide aber nicht aus dem Nikotin ableiten lassen. Dabei dürften die Frucht-Geschmacksstoffe deutlich höhere Risiken bergen als die Basisliquide, da die beiden Liquide mit Frucht-Aroma jeweils eine signifikant höhere Zelltoxizität aufwiesen, als deren Basisliquide ohne Frucht-Geschmacksstoffe.

Die Hypothese, dass zugefügte Frucht-Aromastoffe hauptverantwortlich für die Toxizität sind, wurde in der vorliegenden Studie durch die Ergebnisse eines Vergleichs zwischen den FL und ihren Ausgangslösungen untermauert. Für beide Frucht-Aromastoffe ergab sich hier eine signifikant höhere Zelltoxizität.

Dieses Ergebnis ist kompatibel mit den Resultaten einer Studie von Romagna et al.. Die Studie untersuchte die Zelltoxizität von 21 mit Aromastoffen versehenen Liquiden an Fibroblasten und zeigte unterschiedliche Zellschädlichkeit. Die Ausgangslösungen der Liquide wiesen dabei ähnliche Bestandteile (PG, G und Nikotin) in ähnlichen Konzentrationen auf. Die Unterschiede der Zytotoxizität konnten folglich nur den Aromastoffen zugeordnet werden (Romagana et al, 2013).

Die Vorliegende Studie basiert auf Untersuchungen mit unverdampften Liquiden. Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die sich mit der verdampften Form von Liquiden befassen. 2015 wurden von Lerner et al. die toxischen Auswirkungen von E-Liquid Dampf, der resultierende oxidative Stress und die entzündliche Antwort in vitro mit humanen Lungenepithelzellen und in vivo an Mauslungen untersucht. Oxidativer Stress und Entzündungen sind bekannte Mediatoren aus konventionellen Tabakprodukten, die mit einem erhöhten Risiko von Lungenkrankheiten in Verbindung gebracht werden (Yao et al., 2011).

Oxidantien, die in Zigarettenrauch enthalten sind, spielen offenbar eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) und bei der Entstehung von Lungenkrebs (Sundar et al., 2013).

Lerner et al. zeigten, dass Oxidantien durch das Verdampfen von E-Liquide erzeugt werden können, dass es Unterschiede in der Reaktivität der Oxidantien, abhängig von der Aromastoffen, gibt und dass E-Liquide Auswirkungen auf die Morphologie und die Vitalität von Lungengewebe haben. In dem in vivo Mausmodell zeigte sich eine Reduktion der Glutathion-Reduktase, welcher auf eine oxidative Belastung hindeutet. Daraus wurde abgeleitet, dass der Dampf von E-Liquid lungenschädigende Eigenschaften besitzt (Lerner et al., 2015).

#### **4.4.1 Nikotin**

Nikotin in den getesteten Konzentrationen scheint nach der vorliegenden Studie keine schädigenden Eigenschaften zu haben. Auch in anderen Studien wurde aufgezeigt, dass Nikotin keine zellschädigenden Eigenschaften besitzt (Laytragoon-Lewin et al., 2011; Argentin et al., 2004) und auf Myokardzellen sogar einen antiapoptotischen Effekt hat (Suzuki et al., 2003). Allerdings gibt es neue Untersuchungen, welche sich mit der Schädlichkeit von Nikotin in E-Liquid Dampf befasst haben. Yu et al. zeigten 2016, dass der Dampf von E-Liquid mit und ohne Nikotin eine zytotoxische Wirkung auf Epithelzellen hat. Es zeigte sich, dass die Zellreihen, die mit nikotinfreiem Dampf inkubiert wurden, eine 5-fache erhöhte Zellsterblichkeit, die Zellreihen, die mit nikotinhaltigem Dampf inkubiert wurden, jedoch eine 10-fach erhöhte Sterblichkeit aufwiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Nikotin und dem gemessenen Zellschaden besteht (Yu et al., 2016).

## 4.5 Genotoxizität der Liquide

Die Genotoxizität wurde in dem Versuchsaufbau der vorliegenden Studie wurde mittels alkalischer Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) bestimmt. Da diese Methode mit hoher Empfindlichkeit Einstrangbrüche (single-strand breaks = SSBs) und Doppelstrangbrüche (double-strand breaks = DSBs) der DNA nachweisen kann. Da SSB häufiger auftreten als DSB oder andere DNA-Veränderungen, gilt die alkalischen Mikrogelelektrophorese als hochsensitiv für die Quantifizierung niedriger Grade von DNA-Beschädigungen (Singh et al., 1988; Harréus et al., 1999).

Im Hinblick auf die Genotoxizität zeigten sich bei dem Tabakliquid nur bei der einmaligen Gabe über 24 Stunden und bei einer Konzentration von 15% eine Signifikanz, wohingegen die wiederholte Gabe keine signifikante Schädigung erzeugte. Bei dem Basisliquid Tabak ließ sich keine signifikante Schädigung nachweisen. Bei den Fruchtliquiden jedoch zeigte sich sowohl in der einmaligen, als auch der wiederholten Inkubation ab 15% eine statisch signifikante Genotoxizität. Die Basisliquide Frucht führten hingegen nicht zu signifikanten Schädigungen. Damit lässt sich auch aus der Messung der Genotoxizität schlussfolgern, dass die zu den messbaren Schäden führenden Substanzen aus den beigefügten Aromastoffen kommen müssen.

Dieses Ergebnis ist mit den Schlussfolgerungen einer Studie von Willershaus et al. vereinbar: Willershausen et al. untersuchten die Auswirkungen von E-Liquiden auf paradontale Fibroblasten, wobei sie mit Inkubationszeiten bis zu 96 Stunden arbeiteten. Sie zeigten, dass einige Zusätze, besonders in dieser Studie ein Mentholaroma, in E-Liquide zu Schäden der Zellproliferation führen könnten (Willershausen et al., 2014).

Zur Auswertung der alkalischen Mikrogelelektrophorese wurde im Rahmen der vorliegenden Studie neben dem % DNA-Tail-Wert auch das Olive-Tail-Moment (OTM) bestimmt. Dieser Wert ist ebenfalls ein Marker für die Genotoxizität, wobei ein OTM-Wert  $> 2$  eine relevante DNA-Schädigung aufzeigt (Harreus et al., 1999). In den Versuchen zeigte sich für die Fruchtliquide konstant ein OTM-Wert von  $> 2$ . In einer vorherigen Studie an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München war die genotoxische Auswirkung von Zigarettenrauchkondensat mit einem ähnlichen Versuchsaufbau und mittels der OTM-Werte untersucht worden (Reiter et al., 2012). Die OTM-Werte, die bei der letztgenannten Studie aufgezeigt wurden, waren nahezu doppelt so hoch, wie der höchste im Rahmen der vorliegenden Studie gemessene OTM-Wert für Fruchtliquide. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die schädlichen Auswirkungen von E-Liquiden geringer sind als die von herkömmlichen Zigaretten.

Zu einer ähnlichen Aussage kamen auch Romagna et al. 2013. Sie untersuchten die Auswirkungen von 21 verschiedenen E-Liquiden und verglichen Ihre Ergebnisse mit den Auswirkungen von Zigarettenrauch.

Sie extrahierten den Dampf von E-Liquiden in Kulturmedium und führten dieses murinen Fibroblasten zu. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass lediglich eines der getesteten E-Liquide eine gering toxische Wirkung habe. Dahingegen zeige der extrahierte Rauch klassischer Zigaretten schon ab einer geringen Konzentration deutliche Auswirkungen (Romagna et al., 2013).

2016 verglichen Farsalinos et al. die Zytotoxizitäten von herkömmlichem Zigarettenrauch und dem Dampf von E-Liquide auf Myokardzellen. Neben den E-Liquiden untersuchten sie auch ein reines Basisliquid, bestehend aus 50% Propylenglykol und 50% Glycerin. Dabei wurde erörtert, dass bei der Pyrolyse von Propylenglykol und Glycerin, wie diese bei der Verbrennung von Tabakprodukten erfolgt, Stoffe wie Formaldehyd und Akrolein entstehen können (Antal et al., 1985; Stein et al., 1983). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass diese Stoffe auch bei dem Verdampfen von E-Liquiden entstehen können (Goniewicz et al., 2013). Zudem ist bekannt, dass Formaldehyd (Szendek et al., 2010) und Akrolein (Wang et al., 2011) zytotoxische Effekte haben. Farsalinos et al. zeigten, dass einige der getesteten Liquide zytotoxische Effekte hatten, jedoch auch, dass die Zell-Viabilität bei den getesteten E-Liquide deutlich höher war, als bei dem getesteten Tabakrauch (Farsalinos et al., 2013).

Zu einer ähnlichen Aussage kamen auch Goniewicz et al.. Sie untersuchten die unterschiedlichen Zusammensetzungen von E-Liquid Dampf mittels Chromatographie und Spektroskopie und kamen zu dem Ergebnis, dass toxische Stoffe in dem Aerosol vorhanden sind, dies aber in einem vielfach geringeren Ausmaß als in herkömmlichem Tabakrauch (Goniewicz et al., 2014).

Auch Scheffler et al. stellten in einer Studie aus 2015 den Rauch von Tabakprodukten dem Dampf von E-Liquide gegenüber und inkubierten menschliche Bronchialepithelzellen mit beiden Substanzen. Sie zeigten, dass es bei beiden Substanzen zu einem Abfall der Viabilität und zu einer Zunahme des oxidativen Stresses kam, diese Effekte jedoch bei Tabakrauch um ein Vielfaches stärker ausgeprägt waren, als bei dem Dampf von E-Liquide (Scheffler et al., 2015).

In den Experimenten der vorliegenden Studie wurde, trotz scheinbarer Parallelen, keine Korrelation zwischen reduzierter Zellgesundheit und DNA-Fragmentierung festgestellt. Daraus lässt sich folgern, dass die gemessenen DNA-Schädigungen keine letalen Zellschädigungen zur Folge hatten und die Zytotoxizität vielmehr durch andere Mechanismen wie oxidativer Stress, Entzündung oder mitochondriale Fehlfunktion erklärt werden sollte (Moghe et al., 2015). Weitere Untersuchungen auf diesem Feld sind erforderlich. Allerdings lässt die Feststellung stärkerer DNA-Fragmentierung bei den Fruchtliquiden im Vergleich zu dem Tabakliquid oder zu beiden Basisliquiden die Annahme zu, dass E-Liquide oder Bestandteile davon mit der DNA der getesteten Schleimhautzellen interagieren und dass einige der Liquide in der Lage sind, relevante Schädigungen zu bewirken.

Die genaue Zusammensetzung der Liquide für E-Zigaretten, insbesondere die Art der zugefügten Aromastoffe, wird von den Herstellern in der Regel nicht bekanntgegeben. Bereits deshalb sind strikte Richtlinien und Regulierungen für Produktion, Kennzeichnung, Vertrieb und Erwerb der Liquide erforderlich. Belastbare wissenschaftliche Untersuchungen sollten ermöglicht und ein Höchstmaß an Sicherheit für die Verbraucher gewährleistet werden. Zwar scheint der Gehalt an kanzerogenen Substanzen in E-Liquiden viel geringer zu sein als in herkömmlichen Zigaretten, allerdings gibt es keine willkürlich festsetzbare Schwelle für kanzerogene Substanzen.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die Mutagenität von Schleimhautzellen durch E-Liquide und ein dadurch bestehendes Risikopotential für die Entstehung von Kopf- und Hals-Tumoren nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Schlussfolgerungen aus der DNA-Fragmentierung müssen auf Gen- und Proteinebenen weiter untersucht werden.

## 4.6 Limitationen

Wie bereits erwähnt, weichen die Laboruntersuchungen in zwei Punkten von der realen Anwendung der Liquide in E-Zigaretten ab:

- (1) E-Zigaretten werden mit E-Liquiden in unverdünnter Form betrieben. Für die Laboruntersuchungen wurden die E-Liquide hingegen verdünnt (untersucht wurden Konzentrationen von 10%, 15% und 25%). Die unverdünnten E-Liquide wiesen eine hohe Zelltoxizität auf und lieferten somit keine hinreichen differenzierbaren Messergebnisse, mit diesen Werten wäre eine Aussage über die Auswirkungen und eine Interpretation der Werte nicht möglich gewesen.
- (2) Zur Entkopplung potentieller Schädigungskausalitäten wurden die Experimente mit unverdampften E-Liquiden durchgeführt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in den E-Zigaretten stattfindende thermische Verdampfung die Auswirkungen auf die Zellen verändern, z.B. durch Änderungen in molekularen Strukturen der Inhaltstoffe.

Die genannten Abweichungen sind bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zu berücksichtigen, schränken die Relevanz der Aussagen im Übrigen jedoch nicht ein.

## 5. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren hat die elektronische Zigarette deutlich an Bekanntheit und Popularität gewonnen. Das Problem hierbei ist, dass die elektronische Zigarette als ungefährliche Alternative zu herkömmlichen Zigaretten angepriesen wird.

Eine wesentliche Rolle spielen dabei E-Liquide. Diese bestehen meist aus Propylenglykol, Glycerin, Nikotin, Wasser und Aromastoffen in unterschiedlicher Zusammensetzung. Diese Liquide treffen nach Verlassen der E-Zigarette, in verdampfter Form als erstes auf menschliches Schleimhautgewebe des oberen Aerodigestivtraktes. Ziel der vorliegenden Studie ist es, die biomolekularen Effekte von E-Liquiden auf menschliche Pharynxgewebekulturen zu untersuchen, um zu bewerten, ob E-Liquide oder einzelne Bestandteile davon einen möglichen Risikofaktor für die Entstehung von Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom (HNSCC) darstellen.

Zu diesem Zweck wurden Schleimhautgewebekulturen (MOC) aus vitalem und gesundem oropharyngealem Schleimhautgewebe hergestellt. In dem Versuchsaufbau wurden zwei Liquide mit Fruchtaroma (FL), ein Liquid mit Tabakaroma (T) (alle mit Nikotin) und deren entsprechende Basismischungen (frei von Nikotin und Aromastoff) in drei verschiedenen Verdünnungen untersucht. Dabei wurden sowohl die Zytotoxizität als auch die Genotoxizität betrachtet. Die Zytotoxizität wurde unter Verwendung des Tetrazolium-8-Assays (WST-8) quantifiziert. Die durch Messung der DNA-Fragmentierung untersuchte Genotoxizität wurde mittels alkalischer Mikrogelelektrophorese bestimmt. In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass alle Liquide ab einer gewissen Konzentration zu einer signifikanten Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen führten. Bei der Auswertung fiel auf, dass beide Liquide mit Fruchtaroma eine höhere Zytotoxizität aufwiesen, als das Liquid mit Tabakaroma. Auch die Genotoxizität zeigte sich bei den Fruchtliquiden signifikant erhöht, wohingegen sich bei der Inkubation mit Tabakliquid keine signifikante DNA-Schädigung zeigte. Aus dieser Untersuchung geht hervor, dass E-Liquide sowohl zyto- als auch genotoxische Wirkungen auf oropharyngeales Gewebe haben, wobei einige der Liquide relevante DNA-Schäden induzieren können. Da DNA-Schäden potentiell zu Mutationen führen, können E-Liquide als Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen nicht ausgeschlossen werden.

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden unter Federführung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C. Welz et al. in einem Artikel im Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology unter dem Titel „Zytotoxic and Genotoxic Effects of Electronic Cigarette Liquids on Human Mucosal Tissue Cultures of the Oropharynx“ veröffentlicht (Welz et al., 2016).



## 6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Modell der genetischen Progression bei Tumoren
- Abbildung 2** Kanzerogenese in 6 Stufen nach Hanahan et al.
- Abbildung 3** Aufbauschema einer elektronischen Zigarette.
- Abbildung 4** Beispielabbildung der 3 Generationen von E-Zigaretten nach Dawkins
- Abbildung 5** Strukturformel von Propylenglykol ( $C_3H_8O_2$ )
- Abbildung 6** Strukturformel von Glycerin ( $C_3H_8O_3$ )
- Abbildung 7** Strukturformel von Nikotin ( $C_{10}H_{14}N_2$ )
- Abbildung 8** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus
- Abbildung 9** Beispielabbildung einer 24-Well-Platte mit Mukosastücken
- Abbildung 10** Mikroskopische Fotografie einer „reifen“ Miniorgankultur, München 2016
- Abbildung 11** Histologischer Schnitt einer „reifen“ Miniorgankultur in HE-Färbung
- Abbildung 12** Anordnungsschema für die Inkubation der Miniorgankulturen.
- Abbildung 13** Berechnung der Vitalität nach Phillips et al.
- Abbildung 14** Transformation von WST-8 in WST-8 Formazan durch Bio reduktion
- Abbildung 15** Comet 6 Auswertung, Schleimhautzelle gefärbt mit Ethidiumbromid, keine Schädigung, München, 2016
- Abbildung 16** Comet 6 Auswertung, Schleimhautzelle gefärbt mit Ethidiumbromid, leichte Schädigung, München, 2016
- Abbildung 17** Comet 6 Auswertung, Schleimhautzelle gefärbt mit Ethidiumbromid, starke Schädigung, München, 2016
- Abbildung 18** Vitalitätsmessung des Basisliquid Frucht, sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25%, n=20; WST-8 Test
- Abbildung 19** Vitalitätsmessung des Basisliquid Tabak sowie des Tabakliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10%, 15% und 25%, mittels WST-8-Test

- Abbildung 20** Vergleich der Zellvitalität für die Fruchtliquide, das Tabakliquid und die Basisliquide in der Konzentration 15% mit WST-8 Test
- Abbildung 21** Messung der Genotoxizität des Basisliquid Frucht sowie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15% bei einmaliger Inkubation für 24 Stunden
- Abbildung 22** 21 Messung der Genotoxizität des Basisliquid Frucht, so wie des Apfel- und Kirschliquid in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, bei einer Inkubation von 5-mal je 2,5 Stunden
- Abbildung 23** Messung der Genotoxizität des Tabakliquid und des Basisliquid Tabak in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, nach einer Inkubation für einmalig 24 Stunden
- Abbildung 24** Messung der Genotoxizität des Tabakliquid und des Basisliquid Tabak in den Konzentrationen 0% (Kontrolle), 10% und 15%, bei 5 mal 2,5-stündiger Inkubation
- Abbildung 25** Vergleich der Inkubationsarten durch Analyse der Genotoxizität des Basisliquid Tabak, des Basisliquid Frucht sowie der Apfel-, Kirsch- und Tabakliquide bei jeweils 15% Konzentration

## 7. Literaturverzeichnis

Antal, M.J.; Mok, W.S.L.; Roy, J.C.; T-Raissi, A. Pyrolytic sources of hydrocarbons from biomass. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1985, 8, 291–303.

Argentin, G.; Cicchetti, R. Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol. Sci.* 2004, 79, 75–81.

Armitage, W. J. and P. Mazur (1984). "Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes." *Am J Physiol* 247(5 Pt 1): C382-389.

Arulanantham K, Genel M. Central nervous system toxicity associated with ingestion of propylene glycol. *J Pediatr.* 1978;93(3):515–516. (PubMed)

Ayers J W, Ribisl K M, Brownstein J S . Tracking the rise in popularity of electronic nicotine delivery systems (electronic cigarettes) using search query surveillance. *American Journal of Preventive Medicine* 2011;40:448–53.

Bahl V, Lin S, Xu N, et al. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol* 2012;34:529–37 (PubMed)

Barbirato F., Chedaille D., and Bories A. (1997a) Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 441–446.

[http://www.bmel.de/DE/Ernaehrung/Gesundheit/NichtRauchen/\\_Texte/EUTabakprodukttrichtlinieNeuordnung2014.html?nn=309766](http://www.bmel.de/DE/Ernaehrung/Gesundheit/NichtRauchen/_Texte/EUTabakprodukttrichtlinieNeuordnung2014.html?nn=309766)

Eingesehen am 07.05.2017

Blot, W. J., et al. (1988). "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer." *Cancer Res* 48(11): 3282-3287.

Cahn Z, Siegel M. Electronic cigarettes as a harm reduction strategy for tobacco control: a step forward or a repeat of past mistakes. *Journal of Public Health Policy* 2011;32:16–31.

Califano, J., et al. (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." *Cancer Res* 56(11): 2488-2492.

Centers for Disease Control and Prevention. Ingestion of cigarettes and cigarette butts by Rhode Island children. *MMWR* 1997;46:125–8 (PubMed)

Choi W.J. (2008) Glycerol-based biorefinery for fuels and chemicals. *Recent Pat Biotechnol* 2: 173–180. (PubMed)

Cobb, C. O., et al. (2015). "Electronic cigarettes and nicotine dependence: evolving products, evolving problems." *BMC Med* 13(1): 119.

Colin T., Bories A., Lavigne C., and Moulin G. (2001) Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum* . *Curr Microbiol* 43: 238–243. (PubMed)

Connolly M, Buckley DA. Contact dermatitis from propylene glycol in ECG electrodes, complicated by medicament allergy. *Contact Dermatitis*. 2004;50(1):42.

Dawkins, L ( 2013) Electronic Cigarette: What are they and are they effective? Mündlicher Vortrag, einsehbar unter <http://ecigarettereviewed.com/wp-content/uploads/2013/11/Electronic-Cigarettes-What-are-they-and-are-they-effective-Dr.-Lynne-Dawkins-E-Cigarette-Summit.pdf>  
Eingesehen am 16.07.2015

DKFZ, 2014:  
[https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/Stellungnahmen/DKFZ\\_Stellungnahme\\_E-Zigarette\\_2014.pdf](https://www.dkfz.de/de/tabakkontrolle/download/Publikationen/Stellungnahmen/DKFZ_Stellungnahme_E-Zigarette_2014.pdf)  
Eingesehen am 11.11.2018

El-Sayed F, Bayle-Lebey P, Marguery MC, Bazex J. Contact dermatitis from propylene glycol in Rifocine. *Contact Dermatitis*. 1995;33(2):127-128.

ENVIRON International Corporation. Equipment-based guidelines for the use of theatrical smoke and haze. Report prepared for Equity-League Pension and Health Trust Funds, 2001.  
<http://www.actorsequity.org/docs/safesan/equipment-based.pdf>  
Eingesehen am 01.07.2013

Farrar CW, Bell HK, King CM. Allergic contact dermatitis from propylene glycol in Efudix cream. *Contact Dermatitis*. 2003;48(6):345.

Farsalinos KE, Romagna G, Alliffranchini E, Ripamonti E, Bocchietto E, Todeschi S, Tsiapras D, Kyrzopoulos S, Voudris V. Comparison of the cytotoxic potential of cigarette smoke and electronic cigarette vapour extract on cultured myocardial cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(10):5146-62.

Fisher D A. Allergic contact dermatitis to propylene glycol in calcipotriene ointment. *Cutis*. 1997;60(1):43-44.

Fligner CL, Jack R, Twiggs GA. et al. Hyperosmolarity induced by propylene glycol, a complication of silver sulfadiazine therapy. *JAMA*. 1985;253(11):1606–1609. (PubMed)

Food and Drug Administration. Generally Recognized as Safe (GRAS) status of propylene-glycol.<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogsListing&id=26>  
2. Eingesehen am 29.04. 2010.

[http://www.gekid.de/Atlas/CurrentVersion/Help/Altersspezifische%20Angaben\\_2014.xlsx](http://www.gekid.de/Atlas/CurrentVersion/Help/Altersspezifische%20Angaben_2014.xlsx)  
Eingesehen am 01.05.2015

<http://www.gekid.de/Atlas/CurrentVersion/Mortalitaet/atlas.html>  
Eingesehen am 01.05.2015

<http://www.gekid.de/Atlas/CurrentVersion/Inzidenz/atlas.html>  
Eingesehen am 01.05.2015

A, Gilbert. H. (1965). Smokeless non-tobacco cigarette, Google Patents.

Glasgow AM, Boeckx RL, Miller MK. et al. Hyperosmolarity in small infants due to propylene glycol. *Pediatrics*. 1983;72(3):353–355. (PubMed)

Goldenberg, D., et al. (2004). "Habitual risk factors for head and neck cancer." *Otolaryngol Head Neck Surg* 131(6): 986-993.

Goniewicz, M.L.; Knysak, J.; Gawron, M.; Kosmider, L.; Sobczak, A.; Kurek, J.; Prokopowicz, A.; Jablonska-Czapla, M.; Rosik-Dulewska, C.; Havel, C.; Jacob, P.; Benowitz, N. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob. Control* 2013  
doi:10.1136/tobaccocontrol-2012-050859.

Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sob- czak A, Kurek J, Prokopowisz A, Jablonska-Czapla M, Rosik-Dulewska C, Havel C, Jacob P, Benowitz N. Lev- els of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23(2):133-9.

Guha, N., et al. (2007). "Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies." *Am J Epidemiol* 166(10): 1159-1173.

- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hannuksela M, Forstrom L. Reactions to peroral propylene glycol. *Contact Dermatitis*. 1978;4(1):41-45.
- Harreus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H. (Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract). *Laryngorhinootologie*. 1999;78(4):176-81.
- Hartmann, M. (2009). Genoprotektive Effekte von Celebrex® sowie Mutagensensitivität im CyclinD1 bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des oberen Areodigestivtraktes
- Hashibe, M., et al. (2007). "Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." *J Natl Cancer Inst* 99(10): 777-789.
- Hashibe, M., et al. (2009). "Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(2): 541-550.
- Health Council of the Netherlands. Propylene glycol (1,2-Propanediol); Health-based recommended occupational exposure limit. The Hague: Health Council of the Netherlands publication no. 2007/02OSH, pp.
- Ho, P. S., et al. (2002). "The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area." *J Oral Pathol Med* 31(4): 213-219.
- Husari A, Shihadeh A, Talih S, Hashem Y, El Sabban M, Zaatari G. Acute exposure to electronic and combustible cigarette aerosols: effects in an animal model and in human alveolar cells. *Nicotine Tob Res*. 2015;18(5):613-9.
- IARC (1994). International Agency for Research on Cancer (IARC) (1994). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some industrial Chemicals. Propylene oxide. 60,
- Imhoff van, L. C., et al. (2015). "The prognostic value of continued smoking on survival and recurrence rates in head and neck cancer patients: A systematic review." *Head Neck*.
- Aufbauschema einer elektronischen Zigarette:  
<https://www.innocigs.com/blog/e-zigarette-funktion-aufbau/>  
 Eingesehen am 26.05.2019

Kelner MJ, Bailey DN. Propylene glycol as a cause of lactic acidosis. *J Anal Toxicol.* 1985;9(1):40–42.

Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harreus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63:141-147 (2001).

Laugesen M. Safety report on the Ruyan e-cigarette cartridge and inhaled aerosol. Christchurch: Health New Zealand; 2008. p. 1–22.

Laytragoon-Lewin, N.; Bahram, F.; Rutqvist, L.E.; Turesson, I.; Lewin, F. Direct effects of pure nicotine, cigarette smoke extract, Swedish-type smokeless tobacco (snus) extract and ethanol on human normal endothelial cells and fibroblasts. *Anticancer Res.* 2011, 31, 1527–1534.

Lerner CA, Sundar IK, Yao H, Gerloff J, Ossip DJ, Mc-Intosh S, Robinson R, Rahman I. Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116732.

Lim, T. Y., et al. (2014). "Propylene glycol toxicity in children." *J Pediatr Pharmacol Ther* 19(4): 277-282.

Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis.* 2008;23(3):171-82.

Macias Garcia, B., et al. (2012). "Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential." *Theriogenology* 77(7): 1280-1289.

Martin G, Finberg L. Propylene glycol: a potentially toxic vehicle in liquid dosage form. *J Pediatr.* 1970;77(5):877–878. (PubMed)

Moghe A, Ghare S, Lamoreau B, Mohammad M, Barve S, McClain C, Joshi-Barve S. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicol Sci.* 2015;143(2):242-55.

Ndiaye, C., et al. (2014). "HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Oncol* 15(12): 1319-1331.

Nicol R.W., Marchand K., and Lubitz W.D. (2012) Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1865–1875. (PubMed)

Noel J.K, Rees V.W., Connolly G.N. Electronic cigarettes: a new ‘tobacco’ industry? *Tobacco Control* 2011;20:81.

Nwachukwu R.E.S., Shahbazi A., Wang L., Ibrahim S., Worku M., and Schimmel K. (2012) Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes*. *AMB Express* 2: 20.

O'Donnell J, Mertl SL, Kelly WN. Propylene glycol toxicity in a pediatric patient: the dangers of diluents. *J Pharm Pract.* 2000;13(3):214–224.

Oestling O., Johanson K.J. Microgelelectrophoretic study of radiation –induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) 123: 291-298

Olive P.L., Banath J.P. Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: “tail moment” as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.* (1993) 294: 275-283

Ordóñez J, Forrester MB, Kleinschmidt K. Electronic cigarette exposures reported to poison centers. *Clin Toxicology* 2013;51:685

Pauly J, Li Q, Barry MB. Tobacco-free electronic cigarettes and cigars deliver nicotine and generate concern. *Tob Control.* 2007;16(5):357.

Phillips H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture*. Kruse P.F.(Hrsg.), Academic Press, New York (1973): 407-408

Preston-Martin, S., et al. (1988). "Prior exposure to medical and dental x-rays related to tumors of the parotid gland." *J Natl Cancer Inst* 80(12): 943-949.

[http://www.promokine.info/fileadmin/PDFs/All\\_PDFs/PK-CA705-CK04-100.pdf](http://www.promokine.info/fileadmin/PDFs/All_PDFs/PK-CA705-CK04-100.pdf)

Eingesehen am 10.04.2015

RAC Opinion proposing harmonised classification and labeling at EU level of Nicotine abgerufen am 07.05.2017.

Raymond GE. Recommended exposure guidelines for glycol fogging agents. Report prepared for Entertainment Services and Technology Association, 1997.

<http://www.lemaitreltd.com/pdf/Cohen%20Report.pdf>

Eingesehen am 05.07.2013



- Reiter M, Baumeister P, Boeck D, Schwenk-Zieger S, Harreus U. Reduction of DNA damage by curcumin and celecoxib in epithelial cell cultures of the oropharynx after incubation with tobacco smoke condensate. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3185-9.
- Robertson, O. H., et al. (1947). "Tests for the chronic toxicity of propylene glycol and triethylene glycol on monkeys and rats by vapor inhalation and oral administration." *J Pharmacol Exp Ther* 91(1): 52-76.
- Roger V., Fonty G., Andre C., and Gouet P. (1992) Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Curr Microbiol* 25: 197–201. (PubMed)
- Romagna G, Alliffranchini E, Bocchietto E, Todeschi S, Esposito M, Farsalinos KE. Zytotoxicity evaluation of electronic cigarette vapor extract on cultured mammalian fibroblasts (ClearStream-LIFE): comparison with tobacco cigarette smoke extract. *Inhal Toxicol.* 2013;25(6):354-61.
- Rossi D.M., Da Costa J.B., De Souza E.A., Peralba M.C.R., and Ayub M.A.Z. (2012) Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from the environmental consortia. *Renew Energy* 39: 223–227.
- Sancilio S, Gallorini M, Cataldi A, di Giacomo V. Cytotoxicity and apoptosis induction by e-cigarette fluids in human gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig.* 2015;20(3):477-83.
- Scheffler, S., et al. (2015). "Evaluation of E-cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells." *Int J Environ Res Public Health* 12(4): 3915-3925.
- Schuster, Marie-Therese (2009): Die antioxidative Wirkung von Cyclooxygenase-2-Hemmern gemessen an Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
- Shiverick KT, Salafia C. Cigarette smoking and pregnancy. I: Ovarian, uterine and placental effects. *Placenta* 1999;20:265–72.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* (1988) 175: 184-191
- Solanki, A., et al. (2014). "Electronic cigarettes: facts and myths." *Indian J Chest Dis Allied Sci* 56(4): 263-265.

Solomon B.O., Zeng A.P., Biebl H., Schlieker H., Posten C., and Deckwer W.D. (1995) Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J Biotechnol* 39: 107–117.

Stein, Y.S.; Antal, M.J.; Jones, M.J. A study of the gas-phase pyrolysis of glycerol. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1983, 4, 283–296.

Steinsvag, S. K., et al. (1991). "Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system." *Laryngoscope* 101(12 Pt 1): 1323-1331.

Strukturformel von Propylenglykol:

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3e/Propylene\\_glycol\\_chemical\\_structure.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3e/Propylene_glycol_chemical_structure.png)  
Eingesehen am 20.03.2017

Strukturformel von Glycerin:

[https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Glycerin\\_Skelett.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Glycerin_Skelett.svg)  
Eingesehen am 20.03.2017

Strukturformel von Nikotin:

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Nikotin\\_-\\_Nicotine.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Nikotin_-_Nicotine.svg)  
Eingesehen am 07.05.2017

Suh, Y., et al. (2014). "Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer." *Cell Death Dis* 5: e1018.

Sundar IK, Yao H, Rahman I (2013) Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxid Redox Signal* 18: 1956–1971. doi: 10.1089/ars.2012.4863 PMID: 22978694

Suzuki, J.; Bayna, E.; dalle Moll, E.; Lew, W.Y. Nicotine inhibits cardiac apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 2003, 41, 482–488.

Szende, B.; Tyihák, E. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. *Cell. Biol. Int.* 2010, 34, 1273–1282.

Talbot P. In vitro assessment of reproductive toxicity of tobacco smoke and its constituents. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 2008;84:61–72.

Trtchounian A, Talbot P. Electronic nicotine delivery systems – is there a need for regulation. *Tobacco Control* 2010;20:47–52.

Tsai, M. H., et al. (2013). "Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas." *Cell Rep* 5(2): 458-470.

Tuohy KA, Nicholson WJ, Schiffman F. Agitation by sedation. *Lancet*. 2003;361(9354):308. (PubMed)

U.S. Department of Health and Human Services. How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the surgeon general. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2010.

Wallner BC, Harreus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH: (Genotoxicity studies in mini-organ cultures of human nasal mucosa). *HNO* 53:1037-1046 (2005).

Wang, L.; Sun, Y.; Asahi, M.; Otsu, K. Acrolein, an environmental toxin, induces cardiomyocyte apoptosis via elevated intracellular calcium and free radicals. *Cell. Biochem. Biophys*. 2011, 61, 131–136.

Welz C., Canis M., Schwenk-Zieger S., Becker S., Stucke V., Ihler F., et al. 2016. Zytotoxic and genotoxic effects of electronic cigarette liquids on human mucosal tissue cultures of the oropharynx. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. 35:343–354.

Werley, M. S., et al. (2011). "Non-clinical safety and pharmacokinetic evaluations of propylene glycol aerosol in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs." *Toxicology* 287(1-3): 76-90.

Wiley Library (2012). Nikotin (MAK Value Documentation in German language, 2003). In *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety* (eds and). doi:10.1002/3527600418.mb5411d0037

Willershausen, I., et al. (2014). "Influence of E-smoking Liquide on human periodontal ligament fibroblasts." *Head Face Med* 10: 39.

Witowski, J. and J. Knapowski (1994). "Glycerol toxicity for human peritoneal mesothelial cells in culture: comparison with glucose." *Int J Artif Organs* 17(5): 252-260.

Yamin CK, Bitton A, Bates DW. E-cigarettes: a rapidly growing Internet phenomenon. *Ann Intern Med*. 2010;153(9):607-9.

Yao H, Rahman I (2011) Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 254: 72–85. doi: 10.1016/j.taap.2009.10.022 PMID: 21296096

Yu, M. C. and J. M. Yuan (2002). "Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." *Semin Cancer Biol* 12(6): 421-429.

Yu, V., et al. (2016). "Electronic cigarettes induce DNA strand breaks and cell death independently of nicotine in cell lines." *Oral Oncol* 52: 58-65.

Zesch, Achim: *Externa - Galenik Wirkung Anwendung*, S. 18, 1988

Zhu SH, Sun JY, Bonnevie E, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 3(Suppl 3):iii3-9.